Aus der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie
(Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. C.F. Hess)
im Zentrum Radiologie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Persistierende DNA-Schäden (Mikronuklei) und Spättoxizität nach multimodaler Radiochemotherapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Leif Hendrik Dröge
aus
Northeim

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: PD Dr. med. H. Wolff

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. P. Virsik-Köpp

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2013

Inhaltsverzeichnis

Seite

1 Einleitung 1
1.1 Rektumkarzinom 1
1.1.1 Anatomische Definition, Risikofaktoren, Pathologie und Inzidenz 1
1.1.2 Stadiengerechte Therapie 2
1.1.3 Aktuelle Studien zur Verbesserung der Therapie des Rektumkarzinoms 8
1.1.4 Klinische Forschergruppe 179 (KFO 179) 9
1.2 Radio– und Chemotherapie 9
1.2.1 Zelluläre Wirkungen der Radiotherapie (RTx) 9
1.2.1.1 Akut- und Spätnebenwirkungen der Radiotherapie des Rektumkarzinoms 10
1.2.1.1.1 Akutnebenwirkungen 11
1.2.1.1.2 Spätnebenwirkungen 13
1.2.2 Chemotherapie (CTx) 15
1.2.2.1 Fluorouracil (5–FU) 15
1.2.2.2 Oxaliplatin 17
1.3 Angewandte Methodik zur Untersuchung zytogenetischer Schäden 18
1.3.1 Periphere Blutlymphozyten (PBL) 18
1.3.2 Mikronukleustest (MNT) 19
1.4 Ziele der Untersuchung 21
2 Material und Methoden 23
2.1 Material 23
2.1.1 Chemikalien 23
2.1.2 Geräte 24
2.1.3 Zubehör 24
2.1.4 Software 26
2.2 Methoden 27
2.2.1 Patientenrekrutierung und Blutentnahmen (BE) 27
2.2.2 Diagnostik, multimodale Therapie und Nachsorgeuntersuchungen (NS) 27
2.2.2.1 Bestrahlungstechnik 28
2.2.2.1.1 3D-konformale Radiotherapie (3DCRT) 29
2.2.2.1.2 Intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT) 30
2.2.2.1.3 Volumetric Modulated Arc Therapy (VMAT) 30
2.2.3 Herstellung von Nährlösung und Reagenzien 30

2.2.4 Isolation der Lymphozyten und Proliferationsaktivierung mit PHA 31
2.2.5 Zytokinesearrest durch Cytochalasin B (Cyt-B) 32
2.2.6 Verdünnung, Cytospin® und Färbung 33
2.2.7 Auszählung der Objektträger mittels Mikroskop 34
2.2.8 Statistische Analysen 37
3 Ergebnisse 38
3.1 Patientenkollektiv 38
3.2 Mikronukleustest und Spättoxizität 39
3.2.1 Mikronukleustest 39
3.2.1.1 Mikrokerne (MK) 39
3.2.1.2 Nukleoplasmatische Brücken (NPB) 41
3.2.1.3 NDI und NDCI 42
3.2.2 Spättoxizität 43
3.3 Korrelation von Spättoxizität und zytogenetischen Schäden 44
3.4 Einfluss weiterer Faktoren auf die Ergebnisse des MNT 45
3.4.1 Zeitpunkt der Blutentnahme 45
3.4.2 Alter und Geschlecht 47
3.4.3 Bestrahlungsart und Bestrahlungsvolumina 47
3.5 Vergleich mit experimentellen Daten des Kollektivs anderer Untersucher 49
4 Diskussion 51
4.1 Persistenz von Strahlenschäden im menschlichen Körper 51
4.1.1 Persistenz nach therapeutischer Strahlenexposition 53
4.1.2 NDI und NDCI: Mitotische Aktivität der PBL 55
4.2 Zytogenetische Schäden und klinische Toxizität nach Radio-(chemo-)therapie 56
4.3 Einflussvariablen: Biologische Faktoren und Bestrahlungsplanung 58
4.3.1 Alter und Geschlecht 58
4.3.2 Bestrahlungsart und Bestrahlungsvolumina 60
4.3.2.1 Biologische Kompartimente und MK: Induktion und zeitlicher Verlauf 62
4.4 Ausblick 65
5 Zusammenfassung 67
6 Anhang: Tab. 15-21 68
7 Literaturverzeichnis 77

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Chemische Struktur von 5-FU (Hennies 2010) 15
Abbildung 2: Wirkungsmechanismen und intrazelluläre Aktivierung von 5-FU (Kaiser 2003) 16
Abbildung 3: Chemische Struktur von Oxaliplatin (Hennies 2010) 17
Abbildung 4: Die wichtigsten Platin-DNA-Addukte innerhalb eines DNA-Stranges (Hennies 2010) 18
Abbildung 5: Nuclear Division Index (NDI) (Fenech 2000, S.87) 20
Abbildung 6: Nuclear Division Cytotoxicity Index (NDCI) (Fenech 2000, S.88) 21
Abbildung 7: Resultat der Zentrifugation des 1:2 mit 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnten Vollbluts in Leucosep™-Röhrchen (Gebrauchsanleitung Leucosep™-Röhrchen Art. Nr. 163290, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) 31
Abbildung 8: Schematische Darstellung von BLZ unter dem Lichtmikroskop im Rahmen der angewandten Methode (Fenech 2000, S.85) 35
Abbildung 9: Schematische Beispiele zur Darstellung von MK unter dem Lichtmikroskop (Fenech 2000, S.86) 36
Abbildung 10: Zelluläre Strukturen, die MK ähneln, jedoch nicht als solche gewertet werden dürfen (Fenech 2000, S. 86) 36
Abbildung 11: Beispiele für BLZ (Fotografien: Canon PowerShot A640) 36
Abbildung 12: Mikrokerne pro 1000 BLZ bei BE 1y und BE 2y 40
Abbildung 13: Korrelation zwischen MK-Ausbeuten einzelner Patienten bei BE 1y und BE 2y 40
Abbildung 14: Nukleoplasmatische Brücken pro 1000 BLZ bei BE 1y und BE 2y 41
Abbildung 15: NDI und NDCI bei BE 1y und BE 2y 42
Abbildung 16: Spättoxizität nach einzelnen Organsystemen 43
Abbildung 17: Spättoxizität und mittlere Anzahl der Mikrokerne bei BE 1y 44
Abbildung 18: Spättoxizität und mittlere Anzahl der Mikrokerne bei BE 2y 45
Abbildung 19: MK-Ausbeuten in Abhängigkeit vom Zeitraum zwischen Operation und BE 46
Abbildung 20: MK-Ausbeuten in Abhängigkeit vom Zeitraum zwischen Ende der CTx und BE 46
Abbildung 21: MK-Ausbeuten in Abhängigkeit vom Alter 47
Abbildung 22: MK-Ausbeuten in Abhängigkeit vom Rektumzielvolumen 48
Abbildung 23: MK-Ausbeuten in Abhängigkeit vom bestrahlten Rektumvolumen 48

Abbildung 24: MK-Ausbeuten im Verlauf der RTx und bei BE 1y und BE 2y 49
Abbildung 25: NDI vor Beginn der RTx und bei BE 1y und BE 2y.....50

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: TNM-Klassifikation, Stadien nach Dukes und UICC-Stadien beim KRK (Hennies 2010) 3
Tabelle 2: Prospektiv-randomisierte Studien, welche eine alleinig adjuvante oder alleinig neoadjuvante Therapie des Rektumkarzinoms zum Gegenstand hatten 5
Tabelle 3: Prospektiv-randomisierte Studien, welche neoadjuvante und adjuvante Therapie des Rektumkarzinoms gegenüberstellten 6
Tabelle 4: CTC-Kriterien zur Radiodermatitis (Sinn et al. 2003, S.391) 11
Tabelle 5: CTC-Kriterien zur Diarrhoe (Sinn et al. 2003, S.380) 12
Tabelle 6: CTC-Kriterien für hämatologische Parameter (Sinn et al. 2003, S.377) 12
Tabelle 7: CTC-Kriterien zu Übelkeit und Erbrechen (Sinn et al. 2003, S.379f) 12
Tabelle 8: CTC-Kriterien für den Urogenitaltrakt (Sinn et al. 2003, S.385) 13
Tabelle 9: Chemikalien 23
Tabelle 10: Geräte 24
Tabelle 11: Zubehör 24
Tabelle 12: Software 26
Tabelle 13: Eigenschaften der Studienpatienten des Arms A 38
Tabelle 14: Eigenschaften der Studienpatienten des Arms B 39
Tabelle 15: LENT/SOMA-Kriterien für die Haut (LENT Conference 1995, S.1091) 68
Tabelle 16: LENT/SOMA-Kriterien für das Rektum (LENT Conference 1995, S.1073) 69
Tabelle 17: LENT/SOMA-Kriterien für Blase und Urethra (LENT Conference 1995, S.1077) 71
Tabelle 18: MK, NPB und Proliferationsindizes bei Blutentnahme 1y 73
Tabelle 19: MK, NPB und Proliferationsindizes bei Blutentnahme 2y 74
Tabelle 20: Grad der Spättoxizität der Studienpatienten nach LENT/SOMA-Kriterien 75
Tabelle 21: Bestrahlungsart und Bestrahlungsvolumina 76

Verzeichnis der Abkürzungen

AF:	azentrische Fragmente
AIO:	Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie
ARO:	Arbeitsgemeinschaft Radiologische Onkologie
BE (1y; 2y):	Blutentnahme(n)
	(„1 year“: Nachsorge nach 1 Jahr; „2 years“: Nachsorge nach 2 Jahren)
BLZ:	binukleäre Lymphozyten
bzw.:	beziehungsweise
CAA:	Chromosomen-Aberrations-Analyse
CAO:	Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Onkologie
CCCG:	Colorectal Cancer Collaborative Group
CD:	cluster of differentiation
CT:	Computertomographie
CTC(AE):	Common Toxicity Criteria (for Adverse Events)
CTx:	Chemotherapie
cUICC:	UICC-Stadium (initiales klinisches Staging)
Cyt-B:	Cytochalasin B
d:	Tag(e)
DACH:	1,2-Diaminocyclohexan
DC:	dizentrische Chromosomen
DCRC:	Dutch Colorectal Cancer Group
3DCRT:	*3D conformal radiotherapy*
DFG:	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DGCV:	Deutsche Gesellschaft für Verdauungs– und Stoffwechselkrankheiten
d. h.:	das heißt
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	deoxyribonucleic acid
DVO:	*dosis volume optimizer*
EORTC:	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FAP:	familiäre adenomatöse Polyposis
FBS:	fetales bovines Serum
FFCD:	Fédération Francophone de Cancérologie Digestive
FISH:	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

5–FU:	Fluorouracil
G0:	Gap 0
G1:	Gap 1
G2:	Gap 2
GAST:	German Advanced Surgical Study Group
GI-Trakt:	Gastrointestinal-Trakt
GITSG:	Gastrointestinal Tumor Study Group
Gy:	Gray
h:	Stunde(n)
Hb:	Hämoglobinwert im peripheren Blut
HEPES:	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNPCC:	hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom
ICRU:	International Commission on Radiation Units and Measurement
IMRT:	intensitätsmodulierte Radiotherapie
JPS:	juveniles Polyposis-Syndrom
KFO:	Klinische Forschergruppe
KO:	Körperoberfläche
KM:	Kontrastmittel
KRK:	kolorektale(s) Karzinom(e)
LENT:	Late Effects Normal Tissues
MeV:	Mega-Elektronenvolt
MK:	Mikrokern(e)
MNT:	Mikronukleustest
M–Phase:	Mitose-Phase
MRT:	Magnetresonanztomographie
NCCTG:	North Central Cancer Treatment Group
NDI:	*Nuclear Division Index*
NDCI:	*Nuclear Division Cytotoxicity Index*
NIH:	National Institutes of Health
NPB	nukleoplasmatische Brücke(n)
NS:	Nachsorgeuntersuchung(en)
NSABP:	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
PBL:	periphere Blutlymphozyten
PBMCs:	im peripheren Blut enthaltene mononukleäre Zellen

PHA:	Phytohämagglutinin
PME:	partielle mesorektale Exzision
PRO:	*progressive resolution algorithm*
RCSG:	German Rectal Cancer Study Group
RCT:	Radiochemotherapie
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
RT:	Raumtemperatur
RTOG:	Radiation Therapy Oncology Group
RTx:	Radiotherapie
SF:	steril filtriert
SOMA:	subjektiv, objektiv, Management, Analytik
S-Phase:	Synthese-Phase
SRCT:	Swedish Rectal Cancer Trial
TAE:	transanale Exzision
TEM:	transanale endoskopische Mikrochirurgie
TME:	totale mesorektale Exzision
TNM:	Tumor, Nodus, Metastase
TP:	Teilprojekt
UICC:	Union internationale contre le cancer
UpM:	Umdrehungen pro Minute
VMAT:	*volumetric modulated arc therapy*
vs.:	versus
XELOX(-RT):	Capecitabin (Xeloda®), Oxaliplatin (Eloxatin®), (Radiotherapie)
ypUICC:	UICC-Stadium (pathologischer Befund) nach neoadjuvanter Therapie
z. B.:	zum Beispiel
ZBT:	Zytokinese-Block-Technik

1 Einleitung

1.1 Rektumkarzinom

1.1.1 Anatomische Definition, Risikofaktoren, Pathologie und Inzidenz

Das Rektumkarzinom wird zur Gruppe der kolorektalen Karzinome (KRK) gezählt. Klinisch wird zwischen Rektum- und Kolonkarzinom unterschieden. Bei den beiden Entitäten wird eine unterschiedliche Therapie durchgeführt, gleichzeitig liegen histopathologisch viele Gemeinsamkeiten vor. Eine Klassifizierung des Rektumkarzinoms erfolgt anhand der mit dem starren Rektoskop gemessenen Distanz vom aboralen Tumorrand zur Anokutanlinie (Junginger & Hermanek 2008).

Das Rektum endet 15 cm ab ano und reicht vom rektosigmoidalen bis zum anorektalen Übergang. Eine Einteilung erfolgt in unteres (<6 cm von der Anokutanlinie oralwärts), mittleres (6 cm bis <12 cm) und oberes (12 cm bis 15 cm) Rektumdrittel (Junginger & Hermanek 2008).

Verschiedene Umweltfaktoren beeinflussen das Auftreten von KRK. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Menge verzehrten Fleisches und dem Auftreten von KRK (Roberts-Thomson et al. 1996). Eine Ernährung mit hohem Ballaststoffgehalt senkt das Risiko der Erkrankung, wobei Inhaltsstoffe von Gemüse einen stärkeren Effekt als jene von Früchten haben (Ghadirian et al. 1997). Der Konsum von Alkohol und Zigaretten und Bewegungsmangel erhöhen das Risiko der Erkrankung (Midgley & Kerr 1999).

Patienten mit positiver Familienanamnese für das KRK haben ein erhöhtes Erkrankungsrisiko (Graeven & Schmiegel 2004). Andere hereditär bedingte Risikofaktoren sind die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) mit einer Erhöhung des Risikos für KRK bis auf 100%, das hereditäre non–polypöse Kolonkarzinom (HNPCC, Lynch-Syndrom) mit einer Erhöhung auf 80% bis 100%, das Peutz–Jeghers–Syndrom mit einem Risiko von 40% und das juvenile Polyposis–Syndrom (JPS) mit einem Risiko von 20% bis 60% (Graeven & Schmiegel 2004). Prädisponierende Erkrankungen sind die chronisch–entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Graeven & Schmiegel 2004). 90% aller KRK entstehen aus Epitheldysplasien und stellen Adenokarzinome dar, 5-10% sind muzinöse Adenokarzinome und 1% Siegelringzellkarzinome (Graeven & Schmiegel 2004).

Die Inzidenz des KRK steigt seit den 1970er Jahren und liegt zurzeit bei 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland mit abnehmender Letalität für Männer und Frauen

(RKI 2000, Schmiegel et al. 2008). Mit 29.000 Sterbefällen pro Jahr in Deutschland ist das KRK die zweithäufigste Krebstodesursache für beide Geschlechter (RKI 2000). Die über alle Stadien des KRK gemittelte 5–Jahres–Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt 56% (Bertz et al. 2006).

Das KRK ist bei Frauen nach dem Mammakarzinom und bei Männern nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste Tumorerkrankung (Bertz et al. 2006). Das Erkrankungsalter für das KRK liegt bei Männern im Durchschnitt bei 69 Jahren und bei Frauen bei 75 Jahren (Bertz et al. 2006). Nach dem 80. Lebensjahr erkranken pro Jahr 470 von 100.000 Frauen und jenseits des 85. Lebensjahres über 500 von 100.000 Männern (Bertz et al. 2006).

Das Rektum ist die häufigste Lokalisation der KRK mit 30% aller Karzinome (Herfarth & Kraus-Tiefenbacher 2007). Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen beträgt für das Rektumkarzinom in Deutschland 50.000 (Schmiegel et al. 2008). Das Rektumkarzinom ist in der westlichen Welt in der Allgemeinbevölkerung die dritthäufigste Krebserkrankung, bei Nichtrauchern ist es die häufigste (Parkin et al. 2005).

1.1.2 Stadiengerechte Therapie

Die Therapie des KRK erfolgt je nach Ausbreitung und Lokalisation des Karzinoms. Dukes (Dukes & Bussey 1958) unterschied Tumoren mit Beschränkung des Wachstums auf die Darmwand (Dukes A), Tumoren mit Wachstum darüber hinaus ohne Beteiligung von Lymphknoten (Dukes B), Tumoren mit Lymphknotenbeteiligung (Dukes C) und Tumoren mit Fernmetastasen (Dukes D). Die Dukes-Klassifikation wurde durch die Stadien der UICC (Union internationale contre le cancer, UICC 2002) abgelöst. Das Stadium wird mit Hilfe der TNM(Tumor, Nodus, Metastase)–Klassifikation ermittelt (Hermanek et al. 1999). Es werden Primärtumor (T), Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) für die Einteilung bewertet (Tabelle 1).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation, Stadien nach Dukes und UICC-Stadien beim KRK (Hennies 2010)

TNM-Klassifikation		**Dukes-Stadium**	**UICC-Stadium**
Tis	Carcinoma in situ	-	-
T1 T2 N0; M0	Muscularis propria nicht befallen Muscularis propria befallen	A	I
T3 T4 N0; M0	Subserosa befallen Befall angrenzender Organe oder Penetration des viszeralen Peritoneums	B	II
N1 N2 jedes T MO	1-3 regionäre Lymphknoten befallen >3 regionäre Lymphknoten befallen	C	III
M1 jedes T jedes N	Fernmetastasen	D	IV

Trotz identischer Histopathologie und Risikofaktoren werden Rektum– und Kolonkarzinome bei kurativem Ansatz unterschiedlich therapiert. In den UICC–Stadien I und II werden Kolonkarzinome primär operiert, beim lokal fortgeschrittenen UICC–Stadium III erfolgt nach der Operation eine adjuvante Chemotherapie (CTx) (Moertel et al. 1990).

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Patienten mit Rektumkarzinom untersucht wurden folgt nun die Therapie ebendieser im Detail:

Die chirurgische Tumorresektion hat beim Rektumkarzinom große Bedeutung. Ziel ist eine R0–Resektion, der histopathologisch von Tumorzellen freie Resektatrand (Klein et al. 2003). Prinzipien der Chirurgie sind beim Rektum Radikalität nach proximal (komplette Entfernung des Lymphabflussgebietes entlang der Arterien) und lateral (Resektion des Mesorektums, totale mesorektale Exzision, TME) und eine Entfernung des Tumors en bloc (Pinsk & Phang 2007). Die Fragestellung der lokalen Resektion (transanale Exzision, TAE; transanale endoskopische Mikrochirurgie, TEM) bei Frühkarzinomen (UICC-Stadium I) wird kontrovers diskutiert. Der Vorteil der Radikalität muss balanciert werden mit dem Risiko von OP-Komplikationen (z. B. Anastomoseninsuffizienz, bei konventionellen Verfahren) sowie dem kleineren Operationszugang und hohen Rezidivraten bei der TAE (Léonard et al. 2012).

Wichtigster Prognosefaktor ist das Tumorstadium (Stocchi et al. 2001). Vor allem lokal fortgeschrittene Rektumkarzinome der UICC–Stadien II und III zeigen Lokalrezidive und Fernmetastasen auch nach optimaler chirurgischer Therapie (Schaefer et al. 2007). Die Häufigkeit von Lokalrezidiven wird beeinflusst durch Ausdehnung, Lokalisation und biologische Eigenschaften des Primärtumors. Weitere Faktoren sind chirurgische Operationstechnik (insbesondere die kunstgerechte mesorektale Exzision) und Durchführung und Qualität neoadjuvanter und adjuvanter Therapien. Die TME kann in den UICC-Stadien II und III die Lokalrezidivrate bedeutend senken und die Prognose erheblich verbessern (Enker et al. 1995). Zur Verbesserung der Prognose sind neben einer Optimierung der chirurgischen Maßnahmen adjuvante und neoadjuvante Therapien (Tabelle 2) erprobt worden:

Untersuchungen zur adjuvanten Radiochemotherapie (RCT) zeigten eine Senkung der Lokalrezidivrate ohne Einfluss auf das Gesamtüberleben im Vergleich zur alleinigen Operation (GITSG 1985) und zur Operation mit alleiniger adjuvanter Chemotherapie (CTx) (Wolmark et al. 2000). Postoperative RCT verglichen mit alleiniger Radiotherapie (RTx) verbesserte das Gesamtüberleben (Krook et al. 1991). Auf Basis dieser Erkenntnisse empfahlen 1990 die „National Institutes of Health Consensus Conference“ (NIH 1990) und 1994 gemeinsam die Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Onkologie (CAO), die Arbeitsgemeinschaft Radiologische Onkologie (ARO) und die Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO) (Mitteilungen der Deutschen Krebsgesellschaft 1994) die kombinierte RCT im Anschluss an die Operation mit einer Bestrahlungsdosis zwischen 45 Gray (Gy) und 55 Gy und eine CTx mit Fluorouracil (5–FU) für die UICC–Stadien II und III.

Die neoadjuvante RTx des Rektumkarzinoms wurde bereits in den 1970er Jahren diskutiert (Higgins et al. 1975). Untersuchungen zeigten eine Senkung der Lokalrezidivrate im Vergleich zur alleinigen Operation (Cedermark et al. 1995, CCCG 2001). Im SRCT (Swedish Rectal Cancer Trial) senkte eine präoperative Hochdosis-RTx (5x5 Gy in einer Woche) im Vergleich zur alleinigen Operation (keine standardisierte TME) die Lokalrezidivrate und brachte einen Überlebensvorteil (SRCT 1997). Eine Metaanalyse bestätigte die Ergebnisse (Camma et al. 2000). Andere randomisierte Studien sowie eine Metaanalyse konnten den Überlebensvorteil entweder nicht oder nur für Subgruppen belegen (CCCG 2001). Eine Studie der DCRC (Dutch Colorectal Cancer Group) verglich präoperative RTx (5x5 Gy in einer Woche) mit alleiniger Operation (standardisierte TME) und zeigte eine Senkung der Lokalrezidivrate ohne Einfluss auf das Gesamtüberleben (Kapiteijn et al. 2001).

Tabelle 2: Prospektiv-randomisierte Studien, welche eine alleinig adjuvante oder alleinig neoadjuvante Therapie des Rektumkarzinoms zum Gegenstand hatten

Studie	Jahr	N	Resultat
GITSG (GITSG 1985)	1985	202	Postoperative RCT ● senkt Lokalrezidivrate ● keine Verbesserung des Gesamtüberlebens
NSABP (Fisher et al. 1988)	1988	555	Postoperative RTx ● senkt Lokalrezidivrate ● keine Verbesserung des Gesamtüberlebens
NCCTG (Krook et al. 1991)	1991	204	Vergleich postoperative RCT mit alleiniger postoperativer RTx ● senkt Lokalrezidivrate ● Verbesserung des Gesamtüberlebens
NSABP (Wolmark et al. 2000)	2000	694	Vergleich postoperative RCT mit alleiniger postoperativer CTx ● senkt Lokalrezidivrate ● ändert nicht Häufigkeit des Auftretens von Fernmetastasen ● kein Effekt auf Gesamtüberleben
SRCT (SRCT 1997)	1997	908	Präoperative Hochdosis-RTx (5x5 Gy in einer Woche, keine standardisierte TME) ● senkt Lokalrezidivrate ● verbessert Gesamtüberleben
DCRC (Kapiteijn et al. 2001)	2001	1805	Präoperative RTx (5x5 Gy in einer Woche, standardisiertes Operationsverfahren (TME)) ● senkt Lokalrezidivrate ● kein Effekt auf Gesamtüberleben

Potentielle Vorteile der präoperativen RTx (verbesserte lokale Kontrolle) und die Erkenntnis, dass CTx zusätzlich zur RTx im adjuvanten Setting das Überleben verbessert, führten zum Ansatz, beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom präoperative RCT mit postoperativer RCT zu vergleichen (Tabelle 3) (Sauer et al. 2004):

Die CAO/ARO/AIO–94-Studie war eine zweiarmige multizentrische randomisierte Studie der Phase III in Deutschland. Sie rekrutierte von 1994 bis 2002 mehr als 800 Patienten und testete einen Prüfarm mit einer neoadjuvanten RCT und einen Kontrollarm mit adjuvanter RCT.

Patienten des Prüfarms erhielten eine Gesamtdosis von 50,4 Gy und Fluorouracil (5–FU) in der 1. und 5. Woche der Therapie. Beim Kontrollarm wurde mit 50,4 Gy und einem Tumorboost von 5,4 Gy bestrahlt und in der 1. und 5. Woche der Therapie 5-FU verabreicht. Im Prüfarm (6%) war die Lokalrezidivrate signifikant niedriger als im Kontrollarm (13%). Im Prüfarm wurde eine signifikant niedrigere chronische (14% vs. 24%) und akute (27% vs. 40%) Toxizität höheren Grades als im Kontrollarm festgestellt. Im Prüfarm lag eine Assoziation mit höheren Raten sphinktererhaltender Operationen bei Patienten mit tiefsitzenden Tumoren vor. Insgesamt wurde ein Vorteil der neoadjuvanten RCT im Gegensatz zur adjuvanten RCT beschrieben, das Gesamtüberleben (5-Jahres-Überleben bei beiden Verfahren 74%) konnte nicht verbessert werden (Sauer et al. 2004).

Die französische FFCD(Fédération Francophone de Cancérologie Digestive)9203-Studie rekrutierte 733 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom und verglich präoperative RCT mit präoperativer RTx bei adjuvanter CTx. Die präoperative RTx bestand aus 25 Fraktionen in 5 Wochen (Gesamtdosis 45 Gy). Die konkomitante CTx beinhaltete 5-FU über 5 Tage, in der 1. und 5. Woche der RTx. Alle Patienten erhielten als adjuvante Therapie 5-FU. Nach RCT traten Lokalrezidive seltener auf (5-Jahres-Inzidenz 8,1% vs. 16,5%). Akuttoxizität der Grade 3 und 4 trat bei RCT vermehrt auf (14,6% vs. 2,7%). Es gab keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf Gesamtüberleben (67,9% vs. 67,4%) und Sphinkter-Erhaltung (Gérard et al. 2006).

Tabelle 3: Prospektiv-randomisierte Studien, welche neoadjuvante und adjuvante Therapie des Rektumkarzinoms gegenüberstellten

Studie	Jahr	N	Resultat
RCSG (Sauer et al. 2004)	2004	823	Präoperative RCT verglichen mit postoperativer RCT ● senkt Lokalrezidivrate ● vermindert Nebenwirkungen ● kein Effekt auf Gesamtüberleben
FFCD 9203 (Gérard et al. 2006)	2006	733	Präoperative RCT verglichen mit präoperativer RTx, adjuvante CTx ● senkt Lokalrezidivrate ● höhere Rate an Nebenwirkungen ● kein Effekt auf Gesamtüberleben

Die neoadjuvante RCT (eine RTx kombiniert mit einer CTx auf Basis von Fluorouracil) gilt seit der Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs– und Stoffwechselkrankheiten (DGCV) 2004 in Bochum als standardmäßiges Therapieregime beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom (Bölke et al. 2005, Roh et al. 2009).

Weder Sauer (Sauer et al. 2004) noch Gérard (Gérard et al. 2006) konnten einen Effekt auf das Gesamtüberleben nachweisen. Lokalrezidivraten werden durch optimale lokale Kontrolle (neoadjuvante 5-FU-basierte RCT und TME) auf 5-10% reduziert. Metastasen treten jedoch noch in 25-30% der Fälle auf, so dass Verbesserungen des Therapieregimes die Integration einer effektiveren Systemtherapie in die multimodalen Konzepte erfordern (Rödel et al. 2007).

Rödel beschrieb eine multizentrische Phase-II-Studie (11 Zentren, 110 Patienten) zur Bewertung der Aktivität und Sicherheit einer neoadjuvanten RCT (XELOX-RT: Capecitabin (Xeloda®), Oxaliplatin (Eloxatin®), Radiotherapie) kombiniert mit adjuvanter (XELOX: Xeloda®, Eloxatin®) Chemotherapie. Capecitabin (oral verfügbare Vorstufe von 5-FU) wird im Tumor selektiv (bei Kombination mit RTx Verbesserung des Effekts) aktiviert. Oxaliplatin ist ebenso ein Kandidat für multimodale Konzepte aufgrund des relativen Fehlens akuter dosis-limitierender Toxizitäten bei Kombination mit RTx und 5-FU/Capecitabin und aufgrund der Eigenschaft als Radiosensitizer. Präoperative XELOX-RT schien verglichen mit präoperativer 5-FU-basierter RCT effektiver in Bezug auf lokale Tumorregression (limitierte Aussage wegen studienübergreifendem Vergleich). Rödel beschrieb eine gute Durchführbarkeit der Therapie (60% aller Patienten erhielten alle 4 geplanten Zyklen XELOX). Ein Ansatz ist nun, Studienkonzepte anzuwenden, die Standard-5-FU-Regime mit intensivierten RCT-Protokollen vergleichen (Rödel et al. 2007). Hofheinz beschrieb eine multizentrische Phase-III-Studie, die Effektivität und Sicherheit des Einsatzes von Capecitabin anstelle von 5-FU bei der RCT des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms verglich. Er beschrieb eine Nichtunterlegenheit des Capecitabin gegenüber 5-FU in Bezug auf 5-Jahres-Überleben (76% vs. 67%), krankheitsfreies Überleben (75% vs. 67%) und Auftreten von Lokalrezidiven (6% vs. 7%) sowie eine niedrigere Rate an Fernmetastasen unter Capecitabin (19% vs. 28%). Hofheinz schloss, dass 5-FU in der (neo-)adjuvanten Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms durch Capecitabin ersetzt werden könnte (Hofheinz et al. 2012).

1.1.3 Aktuelle Studien zur Verbesserung der Therapie des Rektumkarzinoms

Zur Fragestellung der Intensivierung der Systemtherapie führte die RCSG die CAO/ARO/AIO–04-Studie durch. Dies war eine zweiarmige, prospektiv–randomisierte und multizentrische Phase-III–Studie mit dem Titel „Präoperative Radiochemotherapie und adjuvante Chemotherapie mit 5-Fluorouracil plus Oxaliplatin im Vergleich zu einer präoperativen Radiochemotherapie und adjuvanten Chemotherapie mit 5-Fluorouracil beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom im UICC-Stadium II und III“. Rekrutiert wurden Patienten mit einem Rektumkarzinom im Stadium II oder III. Alle Patienten erhielten eine präoperative RCT und eine adjuvante CTx. Im Kontrollarm wurde die CTx alleinig mit 5-FU durchgeführt. Patienten des Prüfarms erhielten prä– und postoperativ eine intensivierte CTx (5–FU und Oxaliplatin). Die Studie untersuchte den Einfluss der intensivierten CTx auf das lokale Tumoransprechen, das Gesamtüberleben und auf die Rate von im Verlauf auftretenden Fernmetastasen. Erste Ergebnisse zeigten, dass die Inkludierung von Oxaliplatin in 5-FU-basierte Therapiemodalitäten realisierbar war (keine erhöhte Akuttoxizität) und zu höheren Raten an pathologisch komplettem Tumoransprechen (17% vs. 13%) als das Standard-5-FU-Regime führte. Zur Bewertung des krankheitsfreien Überlebens steht noch ein weiteres Follow-up aus (Rödel et al. 2012). In der CAO/ARO/AIO–04-Studie der RCSG wurden ausschließlich Patienten mit Karzinomen des mittleren und unteren Rektumdrittels rekrutiert. Frühere Studien stellten die Effektivität der präoperativen Bestrahlung des oberen Drittels des Rektums in Frage (Kapiteijn et al. 2001).

Aus diesem Grund untersuchte seit 2007 unter anderem die Universitätsmedizin Göttingen in der multizentrischen GAST(German Advanced Surgical Study Group)–05-Studie mit dem Titel „Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms (UICC II und III) im oberen Rektumdrittel (12-16 cm ab Anokutanlinie) mittels qualitätsgesicherter totaler (TME) versus partieller mesorektaler Exzision (PME) gefolgt von adjuvanter Standardchemotherapie (5-FU+Folinsäure+Oxaliplatin)“ lokal fortgeschrittene Tumoren des oberen Rektumdrittels. Ziele waren Verbesserung von chirurgischer Therapie (z. B. R0-Resektionsrate, postoperative Morbidität), lokoregionärer Kontrolle und Gesamtüberleben. Bei adjuvanter Chemotherapie mit 5-FU, Folinsäure und Oxaliplatin wurde eine qualitätsgesicherte TME mit einer partiellen mesorektalen Exzision (PME) verglichen.

1.1.4 Klinische Forschergruppe 179 (KFO 179)

Bei der multimodalen Therapie des fortgeschrittenen Rektumkarzinoms im kurativen Ansatz sprechen die Tumoren unterschiedlich auf die präoperative RCT an. Die Ergebnisse reichen von einer kompletten histopathologischen Remission bis zu einem nahezu fehlenden Ansprechen auf die Therapie (Wolff et al. 2010). Auch das den Tumor umgebende Normalgewebe zeigt hinsichtlich der Reaktion auf die Strahlung Unterschiede. Manche Patienten bekommen während der RCT starke Akutreaktionen, während andere schwächere Reaktionen zeigen. Therapieerfolg und therapieassoziierte Nebenwirkungsprofile werden durch die interdisziplinäre KFO 179 im Programm „Biological Basis of Individual Tumor Response in Patients with Rectal Cancer“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) bei Patienten an der Universitätsmedizin Göttingen erforscht. Ziel dieser Untersuchungen ist die Identifizierung prädiktiver Faktoren für das Ansprechen bzw. das zu erwartende Nebenwirkungsprofil bei einzelnen Patienten und damit die Verwirklichung einer individuellen Therapie für das Rektumkarzinom. Im Rahmen einer personalisierten Medizin würden Response– und Toxizitäts–Scores mit Bewertung prädiktiver Faktoren für Wirkungen und Nebenwirkungen der Therapie für jeden einzelnen Patienten angepasste Therapien ermöglichen. Der Patient profitierte von einem verbesserten Therapieerfolg und von reduzierten Nebenwirkungen.
Die KFO 179 ist in acht Teilprojekte (TP) gegliedert, an denen jeweils verschiedene Disziplinen mitwirken. Die Strahlentherapie als TP 6a und die Pharmakologie als TP 6b arbeiten mit der Zielsetzung der „Dokumentation und Prädiktion von Nebenwirkungen einer multimodalen Therapie beim Rektumkarzinom und Aufklärung molekularbiologischer Hintergründe“. Ziel ist die Untersuchung klinischer, biologischer und pharmakologischer Parameter. Diese sollen in die Analyse bekannter und zu identifizierender molekularer Targets als prädiktive Faktoren für das Ansprechen auf eine multimodale RCT eingehen.

1.2 Radio– und Chemotherapie

1.2.1 Zelluläre Wirkungen der Radiotherapie (RTx)

Der wichtigste Angriffspunkt der Strahlung ist die DNA. Ionisierende Strahlen können Schäden verschiedener Art wie Einzel– und Doppelstrangbrüche, Basenschäden und abnorme Verbindungen von Molekülen auslösen (Herrmann und Baumann 1997). Die Integrität des

Genoms wird von Reparaturenzymen aufrechterhalten. Diese reparieren effektiv und schnell die meisten Schäden. Eine nicht bzw. fehlerhaft erfolgte Reparatur der DNA gilt als wichtigster biologischer Mechanismus für die Wirkung der Bestrahlung.
Die Zahl der bei der Bestrahlung entstehenden Schäden an der DNA ist viel größer als die Zahl der Schäden, welche zu Zelltod oder Mutationen führen. Etwa 4.000 bis 5.000 DNA-Schäden sind Folge der Bestrahlung einer Zelle mit 1 Gy. Es entstehen vor allem Basenschäden und Einzelstrangbrüche und etwa 40 Doppelstrangbrüche. DNA–Reparaturenzyme erkennen die Schäden und greifen direkt in die Kontrolle des Zellzyklus ein (Murray & Hunt 1993). Der Zellzyklus kann mit dem G1(Gap 1)- und G2(Gap 2)-Block am G1- und G2-Checkpoint arretiert werden. Der Arrest bis zum Abschluss der Reparatur gewährleistet die Integrität der DNA. Die Strahlensensibilität einer Zelle ist während Mitosephase und G2–Phase am größten und in der S(Synthese)–Phase am geringsten. Bei Vorliegen eines irreparablen Schadens ist es möglich, dass die Zelle über den durch die Phosphorylierung des Zellzyklus–Proteins p53 ausgelösten G1-Block in Apoptose geht (direkter Zelltod). Beim reproduktiven Zelltod verliert die Zelle die unbegrenzte Teilungsfähigkeit. In diesem Fall sind Chromosomenschäden die Ursache dafür, dass Tochterzellen entweder sofort oder verspätet die M(Mitose)–Phase nicht beenden können (Mitose–assoziierter Zelltod). Der beschriebene Zelltod ist entscheidend für die Strahlenwirkung im Tumorgewebe und für das Auftreten von Schäden am Normalgewebe. Einfluss auf das Überleben einer Zelle nach Bestrahlung haben genetisch bedingte intrinsische Strahlenempfindlichkeit, Zellzyklusphase, Fraktionierung der Strahlendosis und An– oder Abwesenheit von Sauerstoff im Gewebe (Tubiana 1990). Fehlerhafte Reparatur von Schäden der DNA kann Mutationen auslösen (Herrmann und Baumann 1997). Diese treten statistisch selten in kodierenden DNA–Sequenzen auf, da der überwiegende Anteil der DNA nicht direkt in Proteine übersetzt wird.

1.2.1.1 Akut- und Spätnebenwirkungen der Radiotherapie des Rektumkarzinoms

Bei der RTx des Rektumkarzinoms entstehen durch die Reaktion des Normalgewebes diverse Nebenwirkungen. Maßnahmen wie die Fraktionierung der Bestrahlung können die Nebenwirkungen verringern. Nach der RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) und der EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) werden Nebenwirkungen der RTx in Akuttoxizität und Spättoxizität eingeteilt (Cox et al. 1995). Die

akuten Nebenwirkungen treten definitionsgemäß innerhalb von 90 Tagen nach der Therapie auf, Langzeit- oder Spätnebenwirkungen ab dem 91. Tag.

1.2.1.1.1 Akutnebenwirkungen

Für alle Organsysteme wird die Akuttoxizität nach den CTC bzw. CTCAE (Common Toxicity Criteria bzw. Common Toxicity Criteria for Adverse Events) (National Cancer Institute 2010) in Schweregrade eingeteilt. Die CTC(AE)-Kriterien teilen die Nebenwirkungen in fünf Schweregrade ein. Grad 0 bedeutet das Fehlen von Toxizität, Grad 1 milde Toxizität, Grad 2 moderate, Grad 3 schwere und Grad 4 lebensbedrohliche. Grad 5 bedeutet den Tod des Patienten durch die Toxizität.
Akutnebenwirkungen können die Therapie limitieren. Beispielsweise konnten in der GITSG-Studie (1.1.2) 35% der Patienten wegen höhergradiger Toxizität nicht nach dem Studienprotokoll behandelt werden (Rödel et al. 1997). Bestrahlungsvolumen, Geschlecht und Therapiesequenz beeinflussen das Auftreten der Toxizität bei simultaner RCT des Rektumkarzinoms (Rödel et al. 1997). Es treten Hautreaktionen, Durchfälle, Übelkeit, Erbrechen, Leukopenien (Rödel et al. 1997) und Nebenwirkungen im Bereich des Urogenitaltrakts auf.
Laut CTC-Kriterien zur Radiodermatitis bedeutet Grad 1 ein geringes Erythem und reduzierte Schweißsekretion, Grad 2 Epitheliolysen oder ein mäßiges Ödem, Grad 3 feuchte Epitheliolysen mit der Notwendigkeit einer intensiven Lokaltherapie. Grad 4 erfordert einen chirurgischen Eingriff aufgrund von Nekrosen und tiefen Ulzera (Tabelle 4).

Tabelle 4: CTC-Kriterien zur Radiodermatitis (Sinn et al. 2003, S.391)

Grad 1	Geringes blasses Erythem, Haarausfall, Desquamation, reduziertes Schweißsekret
Grad 2	Mäßiges Ödem, mäßiges Erythem, vereinzelt feuchte Epitheliolysen
Grad 3	Ausgeprägtes Ödem und Erythem, konfluierende feuchte Epitheliolysen, intensive Lokaltherapie nötig
Grad 4	Ulzeration, Nekrose, Blutung, operative Therapie nötig

Laut CTC-Kriterien zur Diarrhoe erfasst Grad 1 geringe Vermehrung der Stuhlfrequenz im Vergleich zu sonst (2-3 Stühle pro Tag), Grad 2 mäßige Vermehrung (4-6/d) oder nächtliche Stühle oder mäßige Krämpfe, Grad 3 starke Vermehrung (7-9/d) oder Inkontinenz oder schwere Krämpfe, Grad 4 ≥10 Stühle täglich oder blutige Diarrhoen (Tabelle 5).

Tabelle 5: CTC-Kriterien zur Diarrhoe (Sinn et al. 2003, S.380)

Grad 1	Gering vermehrt im Vergleich zu sonst (2-3 Stühle/Tag)
Grad 2	Mäßig vermehrt (4-6 Stühle/Tag) oder nächtliche Stühle oder mäßige Krämpfe
Grad 3	Stark vermehrt (7-9 Stühle/Tag) oder Inkontinenz oder schwere Krämpfe
Grad 4	Bedrohlich (≥10 Stühle/Tag) oder blutige Diarrhoen

Eine Beteiligung des Knochenmarks bedingt Veränderungen des Blutbilds. Die Laboranalytik erfasst einen Abfall des Hämoglobin-, Leukozyten- und Thrombozytenwertes im peripheren Blut (Tabelle 6).

Tabelle 6: CTC-Kriterien für hämatologische Parameter (Sinn et al. 2003, S.377)

	Grad 1	**Grad 2**	**Grad 3**	**Grad 4**
Hämoglobin (g/100 ml)	10-10,9	8-9,9	6,5-7,9	<6,5
Leukozyten ($x10^9$/l)	3-3,9	2-2,9	1-1,9	<1
Thrombozyten ($x10^9$/l)	75-99,9	50-74,9	25-49,9	<25

Übelkeit und Erbrechen werden nach Ausprägung, Fähigkeit zur Nahrungsaufnahme und Häufigkeit eingeteilt (Tabelle 7).

Tabelle 7: CTC-Kriterien zu Übelkeit und Erbrechen (Sinn et al. 2003, S.379f)

Grad 1	**Übelkeit:** gering, normale Nahrungsaufnahme möglich **Erbrechen:** gering (1x/d)
Grad 2	**Übelkeit:** mäßig, Nahrungsaufnahme vermindert **Erbrechen:** mäßig (2-5x/d)
Grad 3	**Übelkeit:** stark, keine Nahrungsaufnahme möglich **Erbrechen:** stark (6-10x/d)
Grad 4	**Erbrechen:** >10x/d oder Notwendigkeit parenteraler Ernährung

Im Bereich des Urogenitaltrakts auftretende Nebenwirkungen sind Harndrang, Dysurie, Blasenspasmen und Hämaturie. Für Blasenkrämpfe ist maximal Grad 2 definiert. Zur Einteilung des Harndrangs wird die aktuelle Frequenz des Wasserlassens mit der Frequenz vor Therapie verglichen. Für Harndrang und Dysurie existiert kein Grad 4 (Tabelle 8).

Tabelle 8: CTC-Kriterien für den Urogenitaltrakt (Sinn et al. 2003, S.385)

Grad 1	**Harndrang:** gering vermehrt oder nächtlich (<2xN) **Dysurie:** geringe/s Schmerzen/Brennen; keine Therapie **Hämaturie:** nur mikroskopisch sichtbar
Grad 2	**Harndrang:** mäßig vermehrt (≥2xN aber ≤1x/h) **Dysurie:** mäßige/s Schmerzen/Brennen; durch Medikamente kontrollierbar **Blasenspasmen:** vorhanden **Hämaturie:** Makrohämaturie ohne Gerinnsel
Grad 3	**Harndrang:** stark vermehrt (>1x/h) oder Katheterisierung nötig **Dysurie:** starke/s Schmerzen/Brennen, durch Medikamente nicht kontrollierbar **Hämaturie:** Makrohämaturie mit Gerinnsel
Grad 4	**Hämaturie:** Transfusionsbedarf

(N≙Frequenz des Wasserlassens vor Therapie)

1.2.1.1.2 Spätnebenwirkungen

Spättoxizität nach der RTx, CTx oder RCT wird nach den LENT (Late Effects Normal Tissues)/SOMA (subjektiv, objektiv, Management, Analytik)-Kriterien eingeteilt. Sie beinhalten fünf Grade. Grad 0 beschreibt den normalen Funktionszustand des Organs, Grad 5 den Tod des Patienten oder den Funktionsverlust eines Organs oder einer Struktur (Rubin et al. 1995). Anforderungen an das LENT/SOMA-Punktesystem sind Präzision, einfache Anwendung, leichte Verständlichkeit und Reproduzierbarkeit. Weitere Anforderung ist die Beschreibung der Schwere der Nebenwirkungen in aufsteigender Reihenfolge.

Das Akronym „SOMA“ meint vier Kategorien, in die die Kriterien eingeteilt werden: subjektiv, objektiv, Management und Analytik. Der Patient bewertet subjektiv z. B. das Auftreten von Schmerzen in den Graden gelegentlich, intermittierend, persistierend und refraktär. Die körperliche Untersuchung durch den Arzt oder Laboruntersuchungen oder bildgebende Verfahren liefern objektivierbare Parameter wie Gewichtsverlust oder Ödeme. Beim Management der Nebenwirkungen wird beschrieben, ob Symptome auf bestimmte Therapien ansprechen oder ob eine Forcierung der medikamentösen Behandlung nötig wird. Die Analytik umfasst differenzierte und genaue Bildgebung mittels CT (Computertomographie) oder MRT (Magnetresonanztomographie). Aus den Graden der Bereiche wird ein zusammenfassender Grad abgeleitet. Dies stellt die abschließende klinische Beurteilung dar und sollte bei jeder Vorstellung des Patienten im Follow-up erhoben werden

(Rubin et al. 1995). Das Auftreten von Sekundärtumoren wird in der LENT/SOMA-Klassifikation nicht erfasst (Müller et al. 2000).

Für die Therapie des Rektumkarzinoms sind zur Evaluation von Spätnebenwirkungen die Organe Haut, Rektum und Blase wichtig. Bruheim untersuchte 2010 Spätnebenwirkungen und Lebensqualität nach prä- oder postoperativer Radio(chemo-)therapie (50 Gy) und TME beim Rektumkarzinom (Kontrollgruppe: alleinige Operation). Patienten der Studiengruppe hatten eine erhöhte Stuhlfrequenz (>8x/d bei 19% vs. 6%), Patienten ohne Stomaversorgung litten häufiger unter Inkontinenz für flüssigen Stuhl (49% vs. 15%), benötigten häufiger Einlagen (52% vs. 13%) und konnten den Stuhlgang nicht halten (44% vs. 16%). Inkontinenz für Urin trat in der Studiengruppe häufiger auf (9% vs. 2%). Die Patienten der Studiengruppe hatten eine schlechtere soziale Einbindung und eine beeinträchtigte Lebensqualität (Bruheim et al. 2010).

Bei Spätnebenwirkungen an der Haut werden Schuppigkeit, Rauigkeit, Juckreiz und Schmerz bewertet. Die objektivierbaren Kriterien sind Ödeme, Haarausfall, Pigmentveränderungen, Ulzera, Nekrosen, Teleangiektasien, Fibrose, Narben, Atrophie und Schrumpfung. Es wird erfasst, ob Trockenheit, Empfindungen, Ulzera, Ödeme, Narben und Fibrose eine medikamentöse oder chirurgische Therapie erfordern. Farbfotographien der Haut dokumentieren Veränderungen (Tabelle 15, siehe Anhang).

Die LENT/SOMA-Kriterien für das Rektum erfassen die Frequenz von Tenesmen und Schleimhautabgang, die Möglichkeit zur Sphinkterkontrolle und die Häufigkeit von Stuhlgang und Schmerz. Es werden Blutungen, Ulzerationen und Strikturen dokumentiert. Beim Management wird beurteilt, welche Methoden zur Beeinflussung von Tenesmen und Stuhlfrequenz, Schmerzen, Blutungen, Ulzerationen, Strikturen und Sphinkterkontrolle nötig sind. Untersuchungsmodalitäten sind Proktoskopie, CT, MRT, anale Manometrie und Ultraschall (Tabelle 16, siehe Anhang).

Spätnebenwirkungen an Blase und Urethra sind Dysurie, Frequenz des Wasserlassens, Hämaturie, Inkontinenz und abgeschwächter Harnstrahl. Objektivierbar sind Hämaturie, Endoskopie und Maximalvolumen und Residualvolumen der Blase. Beim Management geht es um die notwendigen Behandlungsmaßnahmen (z. B. Katheterisierung, Medikamente, operative Eingriffe). Untersuchungen umfassen Zystographie, volumetrische Analyse, Kontrastmittel-Röntgen, Ultraschall und Elektromyographie (Tabelle 17, siehe Anhang).

1.2.2 Chemotherapie (CTx)

Tumore zeigen autonome Zellvermehrung und unkontrolliertes Wachstum. Bösartige Tumore zeigen infiltratives Wachstum und lymphogene oder hämatogene Metastasierung. Besonders bei Tumoren mit Überschreitung von Organgrenzen, beim Auftreten von Metastasen oder in multimodalen Konzepten zur Steigerung der Strahlenempfindlichkeit des Tumors (z. B. 5-FU und Oxaliplatin, Radiosensitizing) werden systemisch wirksame Arzneimittel in der Therapie angewendet. Die Zytostatika greifen sich schnell teilende Gewebe an und inhibieren Zellwachstum und Zellteilung. Eingeteilt werden die Chemotherapeutika nach ihrem Wirkmechanismus in Alkylanzien, Antimetabolite, Mitosehemmstoffe und Topoisomerasehemmer (Mutschler et al. 2001). Eine Polychemotherapie ist die Kombination mehrer Substanzen in einer Therapie. Sie zeigt einen großen therapeutischen Effekt, da die Arzneimittel jeweils in verschiedenen Phasen des Zellzyklus angreifen. Jeder Patient erhält ein auf Art der Erkrankung und Körperoberfläche abgestimmtes Therapieschema.
Nebenwirkungen der Therapie entstehen durch Schädigung von schnell proliferierenden Geweben (z. B. Schleimhäute, Haut, Hautanhangsgebilde, Gonaden und blutbildende Organe).

1.2.2.1 Fluorouracil (5–FU)

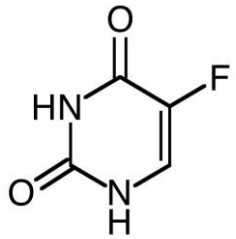

Abbildung 1: Chemische Struktur von 5-FU (Hennies 2010)

Das Chemotherapeutikum Fluorouracil (5–FU) ist ein Antimetabolit und Pyrimidinanalogon. Die Molekülstruktur ähnelt den Basen Cytosin und Thymin (Abbildung 1). Bei der Chemotherapie der KRK ist 5–FU seit den 50er Jahren Mittel der Wahl. Das Arzneimittel ist ein Prodrug und wird erst intrazellulär in die wirksamen Nukleotide überführt (Pizzorno et al. 1997).
5–FU wird zunächst in 5–Fluorouridinmonophosphat (FUMP) überführt. Es existieren drei sich anschließende Wege der Bioaktivierung (Abbildung 2):

1) Durch Nukleotidkinasen wird Fluorouridinmonophosphat (FUMP) über Fluorouridindiphosphat (FUDP) zu Fluorouridintriphosphat (FUTP). Fluorouridintriphosphat (FUTP) und Uridintriphosphat (UTP, natürliches Substrat) konkurrieren kompetitiv um die RNA–Polymerase und den Einbau in die RNA (Pizzorno et al. 1997). Bei Einbau von Fluorouridintriphosphat (FUTP) in die RNA kommt es zur Störung der RNA–Funktion oder zum Zelltod. Der Einbau von Fluorouridintriphosphat (FUTP) in die RNA hemmt die Reifung der ribosomalen RNA (rRNA) (Wilkinson et al. 1975).
2) Die Ribonukleotidreduktase wandelt Fluorouridinmonophosphat (FUMP) in Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) um. Dieses konkurriert mit Desoxyuridinmonophosphat (dUMP, natürliches Substrat) um die Thymidilatsynthetase. Physiologischerweise wird von diesem Enzym das zur DNA-Synthese nötige Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) gebildet (Kaiser 2003). Die Inhibition des Enzyms erfolgt über einen ternären Komplex aus Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) und Methylentetrahydrofolat (MTHF) als Cofaktor (Lipp 1999).

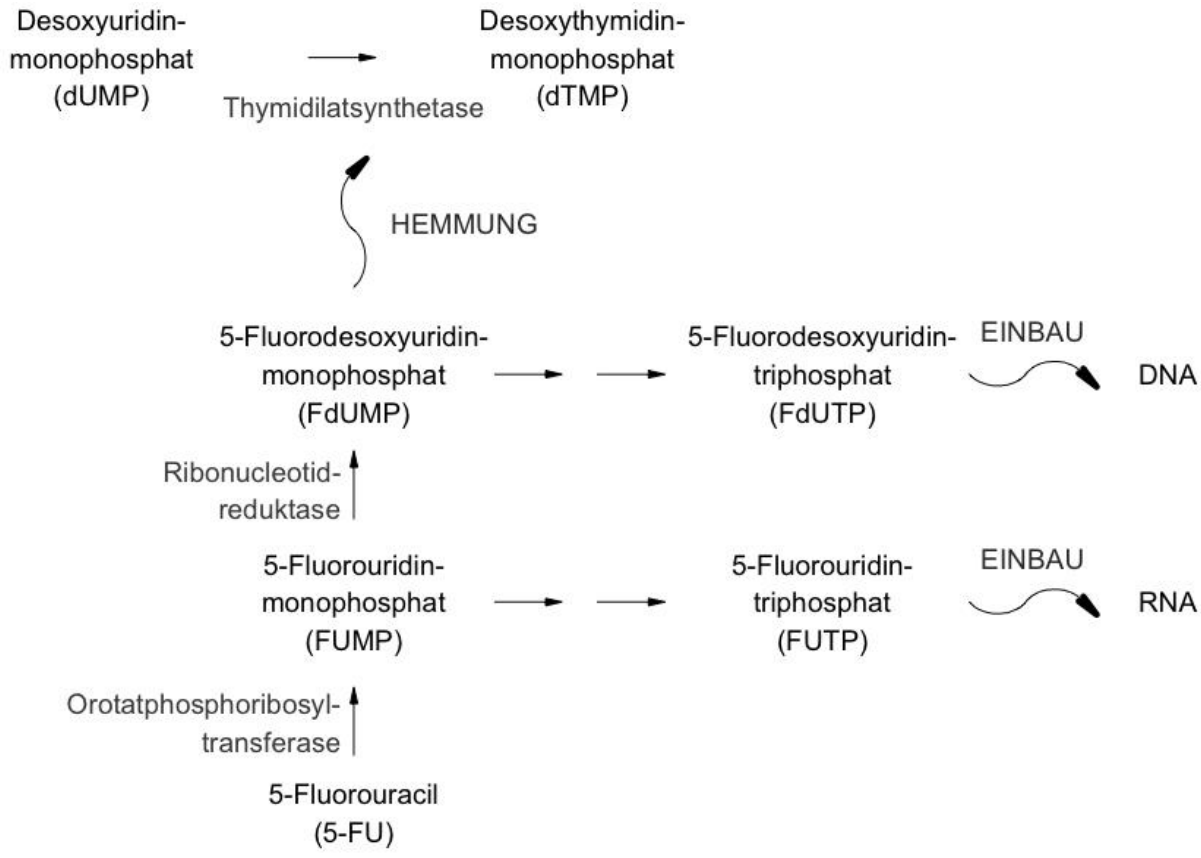

Abbildung 2: Wirkungsmechanismen und intrazelluläre Aktivierung von 5-FU (Kaiser 2003)

3) Durch die Ribonukleotidreduktase gebildetes Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) wird durch Kinasen zu Fluorodesoxyuridintriphosphat (FdUTP). Dieses wird in die DNA eingebaut und beeinträchtigt deren Stabilität. Dieser Effekt ist für die Wirkung von 5–FU zu vernachlässigen, da DNA–Reparaturenzyme das Fluorodesoxyuridintriphosphat (FdUTP) aus der DNA entfernen (Kaiser 2003).

1.2.2.2 Oxaliplatin

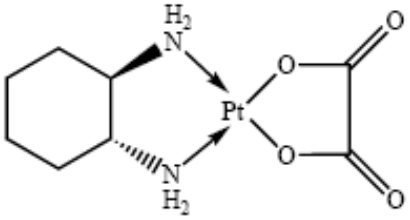

Abbildung 3: Chemische Struktur von Oxaliplatin (Hennies 2010)

Oxaliplatin ist ein Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Platinderivate. Das Platinion liegt im Komplex mit den beiden zweizähnigen Liganden 1,2–Diaminocyclohexan (DACH) und Oxalat vor (Abbildung 3). Die Wirkung entsteht bei vielen Platinverbindungen durch die Bildung von Platin–DNA–Addukten (Abbildung 4). Die Addukte inhibieren die DNA–Synthese und führen zum Zelltod. Es entstehen bei der Biotransformation des Oxaliplatin Aquakomplexe, die in Interaktion mit der DNA zu Intra– und Inter–Strangquervernetzungen führen. Den eigentlichen zytotoxischen Schaden verursachen wahrscheinlich Platin-DNA-Addukte innerhalb eines DNA-Strangs zwischen zwei benachbarten oder dicht beieinander liegenden Guaninen oder einem benachbarten Guanin-Adenin-Basenpaar, da die Addukte häufig und außerdem dazu fähig sind DNA-Replikation und Transkription zu blockieren (NGTATG 1992, Saris et al. 1996, Raymond et al. 1998). Platinverbindungen wie Oxaliplatin erzeugen neben den Platin–DNA–Addukten innerhalb eines Stranges auch Verbindungen zwischen DNA–Strängen und DNA–Protein–Verbindungen.

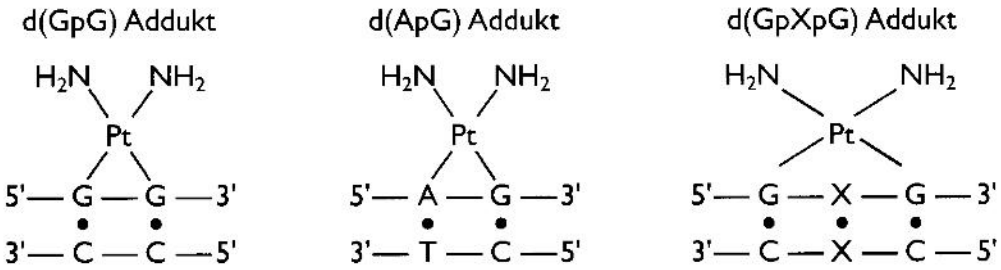

Abbildung 4: Die wichtigsten Platin-DNA-Addukte innerhalb eines DNA-Stranges (Hennies 2010)

1.3 Angewandte Methodik zur Untersuchung zytogenetischer Schäden

1.3.1 Periphere Blutlymphozyten (PBL)

Humane Lymphozyten befinden sich innerhalb des Zellzyklus lange in der G0(Gap 0)–Phase (Ruhephase). Für eine Zellteilung *in vivo* bedarf es der Stimulation durch spezifische Antigene. Für *in-vitro*–Methoden stehen Lymphozyten stimulierende Mitogene wie Phytohämagglutinin (PHA) zur Verfügung. Phytohämagglutinin ist ein aus der Bohnenpflanze *Phaseolus vulgaris* isoliertes Protein und stimuliert vor allem T–Lymphozyten (Beninson et al. 1986). Die Population der B–Lymphozyten wird durch die aktivierten T–Lymphozyten einige Tage später stimuliert (Han & Dadey 1978). In dieser Arbeit wurden wegen der Kultivierung über 96 Stunden überwiegend T-Lymphozyten untersucht.
PBL sind unter mehreren Gesichtspunkten geeignet, den zytogenetischen Effekt einer RTx zu untersuchen:

- PBL haben die ausgeprägteste Radiosensitivität aller Zellen im menschlichen Blut, da sich die dosisabhängige Abnahme ihrer Anzahl im Blutbild stärker zeigt als bei anderen Zellen (Dutreix et al. 1987).
- PBL sind im Körper gleichmäßig verteilt und werden kontinuierlich durchmischt.
- PBL sind ruhende Zellen, konservieren Schäden und geben sie nach Stimulation durch PHA preis.
- Bestrahlung mit geringen Dosen *in vitro* führt zu einem vernachlässigbaren Zelltod bei messbarem zytogenetischen Effekt (Catena et al. 1996). Bei Fraktionierung der RTx überleben genug PBL zur Messung des Effekts.

1.3.2 Mikronukleustest (MNT)

Der MNT ist ein Test auf zellulärer Ebene und erlaubt den Nachweis von Chromosomenschäden. Ein Mikrokern (MK, Mikronukleus) entspricht intrazellulärem, von einer eigenen Plasmamembran umschlossenem Chromatinmaterial. Die Größe des MK beträgt 1/16 bis 1/3 des Zellkerndurchmessers. Ein MK beinhaltet einzelne Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen. MK entstehen wenn das Chromatinmaterial bei der Zellteilung nicht in eine Tochterzelle integriert werden kann. Zellen akkumulieren Chromosomenaberrationen, treten in die Anaphase der Mitose ein und können die Bruchstücke der Chromosomen nicht adäquat auf die Tochterzellen verteilen. Chromatinmaterial verdichtet sich in der folgenden Interphase zu einem oder mehreren MK. Die MK lassen sich durch DNA–Farbstoffe anfärben und unter dem Lichtmikroskop charakterisieren. Cytochalasin B (Cyt-B) kann eingesetzt werden zur Inhibition der Zytokinese. Zellen mit zwei Kernen und im Zytoplasma enthaltenen MK entstehen durch Inhibition der Zytokinese bei möglicher Karyokinese (Hennies 2010).

Die Methodik des MNT wurde in den 50er Jahren mit dem Ziel des Nachweises mutagener Wirkungen entwickelt (Evans et al. 1959). Sie wurde bei der Beschreibung des Zusammenhangs zwischen dem genotoxischen Potential von Agenzien und dem Entstehen von MK in den 70er Jahren erwähnt (Schmid 1975, Fritzenschaf et al. 1993). Die Analyse der den Hämatologen als „Howell–Jolly –Körperchen“ bekannten MK wurde als Möglichkeit zur Detektion chromosomaler Schäden beschrieben (Heddle 1973, Schmid 1975).

Der MNT wurde mit verschiedenen Versuchsparametern und Zellarten durchgeführt. Aufgrund der schnellen Kultivierbarkeit und Empfindlichkeit wird dieser Test häufig bei Lymphozyten angewandt (Fenech & Morley 1985a), Keulers et al. 1998, Tsai et al. 2001, Venkatachalam et al. 1999). Entstehung von MK in Abhängigkeit vom Alter der Probanden und in folgenden Versuchen auch von der Bestrahlungsdosis bei Röntgenstrahlen wurde am Beispiel humaner Lymphozyten untersucht. Die Anzahl der MK korrelierte positiv mit beiden Einflussvariablen (Fenech & Morley 1986). Fenech untersuchte unter anderem die Abhängigkeit der Mikronkernentstehung von einigen Blutplasmawerten (Fenech & Rinaldi 1994, Fenech 1998) und vegetarischer Ernährung (Fenech & Rinaldi 1995) und nutzte den MNT zur Detektion chromosomaler Schäden (Umegaki & Fenech 2000).

Fenech und Morley wandten als Weiterentwicklung die Zytokinese–Block-Technik (ZBT) an (Fenech & Morley 1985a), Fenech & Morley 1986). Es entstehen nach einer einzigen Zellteilung binukleäre Lymphozyten (BLZ). Da nur MK in den BLZ gezählt werden sind die

Vergleiche chromosomaler Schäden in Zellpopulationen hinsichtlich der Zellteilungskinetik zuverlässig (Fenech 2000). Die ZBT konnte die Sensitivität des MNT steigern. Grundlage des ZBT ist die Modulation der Zellteilung. Es wird bei nach einer *in vivo* oder *in vitro* stattgefundenen genotoxischen Behandlung zunächst PHA zur Stimulation der Lymphozyten und 44 Stunden später Cyt-B ins Kulturmedium gegeben (Fenech 1993). Das aus dem Pilz *Drechslera dermatioidea* isolierte Alkaloid Cytochalasin B (Cyt-B) inhibiert die Mikrofilamente und hemmt die Zytoplasmateilung während der Mitose. Nach der Karyokinese entstehen Zellen mit zwei Zellkernen (BLZ). Mit der Methode können alle Zellen, die postexpositionell eine Mitose durchlaufen haben, sichtbar gemacht und die MK charakterisiert werden. Es sind direkte und zuverlässige Vergleiche mit Chromosomenaberrationsuntersuchungen möglich (Fenech 1993). In den 80er Jahren wurde gezeigt, dass durch die ZBT 60% bis 90% aller azentrischen Fragmente (AF) erfasst werden (Ramalho et al. 1988, Littlefield et al. 1989). Dizentrische Chromosomen (DC) stellen sich im MNT als nukleoplasmatische Brücke (NPB) dar. NPB resultieren vermutlich wenn Zentromere von DC oder Chromatiden in der Anaphase zu gegenüberliegenden Zellpolen gezogen werden (Umegaki & Fenech 2000, Crott et al. 2001). Die Herkunft der NPB ist jedoch nicht hinreichend geklärt (Fenech 2007). Es wurde eine enge Korrelation zwischen DC, Ringchromosomen und NPB beschrieben (Thomas et al. 2003).

Der NDI (*Nuclear Division Index*, Abbildung 5) ist ein nützlicher Parameter zum Vergleich von mitogener Antwort der Lymphozyten und zytostatischen Effekten von Agenzien (Fenech 2000). Er lässt sich durch den Anteil der durch Mitose entstandenen BLZ an der Gesamtzellzahl ermitteln.

$$NDI = \frac{\left[M1 + 2(M2) + (3M3) + 4(M4)\right]}{N}$$

Abbildung 5: Nuclear Division Index (NDI) (Fenech 2000, S.87)
(M 1-4: Anzahl der Zellen mit 1-4 Zellkernen; N: Anzahl der insgesamt ausgewerteten Zellen)

Der niedrigste mögliche Wert für den NDI ist 1,0 (alle Zellen mononukleär). Wenn alle Zellen eine Kernteilung durchlaufen haben, ist der Wert 2,0. Der Wert des NDI kann nur über 2,0 liegen, wenn ein substantieller Anteil der Zellen mehr als eine Kernteilung durchlaufen hat und somit mehr als 2 Kerne enthält. Sind z. B. 50% der Zellen binukleär, 10% trinukleär und 10% tetranukleär, so beträgt der NDI 2,2. Für normale PBL unter optimalen Kulturbedingungen kann üblicherweise ein Wert von 1,3 bis 2,2 für den NDI erwartet werden (Fenech 2007).

Der *Nuclear Division Cytotoxicity Index* (NDCI, Abbildung 6) inkludiert auch apoptotische und nekrotische Zellen und erfasst den Zellteilungsstatus genauer. Bei höheren Dosen genotoxischer Behandlung steigt der Anteil dieser Zellen und der NDI wird überschätzt (Fenech 2005).

$$NDCI = \frac{[Apo + Nek + M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]}{N}$$

Abbildung 6: Nuclear Division Cytotoxicity Index (NDCI) (Fenech 2000, S.88)
(Apo: Apoptosen; Nek: Nekrosen; M 1-4: Anzahl der Zellen mit 1-4 Zellkernen; N: Anzahl der insgesamt ausgewerteten Zellen)

Der MNT hat sich zu einem „Cytome-Test“ entwickelt, mit dem Zellproliferation, Zelltod und chromosomale Veränderungen untersucht werden (Umegaki & Fenech 2000, Fenech 2007). Die Nachweismethode wird heute in der Mutagenitätsforschung eingesetzt und ist wichtiger Bestandteil der genetischen Toxikologie.

1.4 Ziele der Untersuchung

Im Teilprojekt der KFO 179 (1.1.4) sollen zuverlässige Prädiktoren für das individuelle Ansprechen auf eine RCT gefunden und ein Modell zur Vorhersage intolerabler klinischer Toxizitäten etabliert werden. Die Hypothese ist, dass die Variabilität von Genen mit Beteiligung der Genprodukte an der Regulierung der Strahlenreaktion zur unterschiedlichen Behandlungsreaktion beiträgt. Zur Prüfung der Hypothese werden genetische Varianten in Form von Polymorphismen mit der klinischen Reaktion und mit biologischen Endpunkten korreliert. Klinische Reaktionen umfassen Akut- und Spättoxizität, Organerhalt, Lebensqualität und histopathologisches Tumoransprechen. Biologische Endpunkte sind zellulärer Stoffwechsel der Chemotherapeutika 5-FU und Oxaliplatin und Verarbeitung des therapieinduzierten DNA-Schadens.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Persistenz von DNA-Schäden in Form von MK nach multimodaler RCT bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom. Die DNA-Schäden werden im Rahmen der jährlichen Nachsorgeuntersuchungen (NS) zu denselben Zeitpunkten wie die Spättoxizität nach LENT/SOMA-Kriterien erfasst, so dass beide Variablen zu definierten Zeitpunkten und im Verlauf der NS in Beziehung zueinander gesetzt werden können. Zusätzliche Ergebnisse des MNT für das Patientenkollektiv vor Therapiebeginn, während der Therapie und am Ende der Therapie, die für diese Arbeit von

anderen Untersuchern der Abteilung bereitgestellt wurden, ermöglichen eine Darstellung des Verlaufs der DNA-Schäden zu diesen 3 Zeitpunkten und bei 2 folgenden NS in der Zusammenschau.

Im Einzelnen werden in der vorliegenden Arbeit etabliert, geprüft und diskutiert:

- Integration der notwendigen Blutentnahmen in die klinische Routine der jährlichen NS der therapierten Rektumkarzinompatienten.
- Erfassung der Ausbeute zytogenetischer Schäden im MNT bei den einzelnen Blutentnahmen.
- Zusammenschau der DNA-Schäden vor Therapiebeginn, während der Therapie, am Ende der Therapie und bei 2 folgenden NS.
- Erfassung der Spättoxizität nach LENT/SOMA-Kriterien im Rahmen der NS.
- Prüfung eines Zusammenhangs zwischen klinischer Ausprägung der Spättoxizität und Persistenz der Schäden im MNT.
- Untersuchung des Einflusses biologischer (Patientenalter, -geschlecht, Zeitpunkte der Blutentnahmen) und klinischer (Bestrahlungsart, Größe der Bestrahlungsvolumina) Faktoren auf die Ergebnisse des MNT.
- Diskussion der Beteiligung einzelner biologischer Kompartimente im Bestrahlungsvolumen an der MK-Induktion.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Für alle Ansätze wurde zweifach destilliertes Wasser mit einer Leitfähigkeit von 0,055µS/cm³ verwendet.

Tabelle 9: Chemikalien

Biocoll Trennlösung, Katalog-Nr. 6115	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Cytochalasin B von *Drechslera dermatioidea*, Katalog-Nr. C6762	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Diff–Quik® Färbeset, Katalog-Nr. 130832	Siemens Dade Behring	Berlin, Deutschland
DMSO Lot.No. 66K2318	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
FBS superior, Katalog-Nr. S0615	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Glucose, Katalog-Nr. G7021	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
HEPES, Katalog-Nr. H7523-250G	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Methanol zur Analyse, Katalog-Nr. 106009	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid, Katalog-Nr. 3570160	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat, Katalog-Nr. 106329	Merck	Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin, Katalog-Nr. A2213	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Phytohämagglutinin L (PHA-L), Katalog-Nr. M5030	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
RPMI 1640 Pulvermedium, Katalog-Nr. T121-05	Biochrom AG	Berlin, Deutschland

2.1.2 Geräte

Tabelle 10: Geräte

Brutschrank, (37°C, 5% CO_2), CO_2-Inkubator Function Line BB16	Heraeus	Hanau, Deutschland
Canon PowerShot A640	Canon	Krefeld, Deutschland
Invertiertes Phasenkontrastmikroskop TELAVAL 31	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Standard 18	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Multilamellenkollimator Millennium 120	Varian Medical Systems	Palo Alto, USA
Pipettierhilfe Pipetboy plus	Integra Biosciences	Chur, Schweiz
Pipetten Eppendorf Research® 200 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research® 1000 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Reinstwassersystem Arium 611VF	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Shandon Cytospin® 4 Zentrifuge, Bestell-Nr. A78300002	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Sterilisator	Memmert	Schwalbach, Deutschland
Wasserbad	GFL	Burgwedel, Deutschland
Werkbank Lamin Air, steril	Heraeus	Hanau, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R, Katalog-Nr. 75003060	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

2.1.3 Zubehör

Tabelle 11: Zubehör

Deckgläser, Artikel-Nr. 3700000	LO-Laboroptik GmbH	Friedrichsdorf, Deutschland
epT.I.P.S. Reloads, 2-200 µl, Bestell-Nr. 0030073428	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. Reloads, 50-1000 µl, Bestell-Nr. 0030073460	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

Eppendorf safe-lock tubes 0,5 ml, Bestell-Nr. 0030121023	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf safe-lock tubes 2,0 ml, Bestell-Nr. 0030120094	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Gewebekulturflaschen, 25 cm^2, 50 ml, mit Filterkappen, Katalog-Nr. 690175	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Gewebekulturflaschen, 75 cm^2, 250 ml, Katalog-Nr. 658170	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Immersionsöl 518F, Bestell-Nr. 444963-0000-000	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Kodan® Tinktur forte farblos, Artikel-Nr. 104005	Schülke & Mayr GmbH	Norderstedt, Deutschland
Leucosep™-Röhrchen, Artikel-Nr. 163290	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Li-Heparin-S-Monovette® zur Plasmagewinnung, Bestell-Nr. 011604001	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
10-ml-Röhren, Nr. 62.554.205	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
50-ml-Röhren, Nr. 62.547.004	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Objektiv Plan 100/1,25 Öl	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Objektiv Plan 16/0,40	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Objektträger, Artikel-Nr. VA11310004FKB	Waldemar Knittel GmbH	Braunschweig, Deutschland
Pasteurpipetten 150 mm	Wilhelm Ulbrich GdbR	Bamberg, Deutschland
Pipetten serologisch, steril, 10 ml, Bestell-Nr. 86.1254.001	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipetten serologisch, steril, 25 ml, 86.1685.001	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Safety-Multifly®-Set mit Adapter, 21 G, Bestell-Nr. 85.1638.235	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Shandon TPX Filterkarten, Produkt-Nr. 5991022	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Sterilfilter Filtropur L 0.2 LS, Bestell-Nr. 83.1827.001	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

Transferpipetten 3,5 ml, Bestell-Nr. 861172	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Trichter Shandon EZ Cytofunnels®, Produkt-Nr. A78710003	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Zählkammer 0,0025 mm^2 (Neubauer improved)	LO-Laboroptik GmbH	Friedrichsdorf, Deutschland

2.1.4 Software

Tabelle 12: Software

Dose Volume Optimizer DVO Version 8.9.08	Varian Medical Systems	Helsinki, Finnland
Eclipse Version 8.9	Varian Medical Systems	Helsinki, Finnland
Excel Version 2000 Version 9.0.2812	Microsoft	Redmond, USA
KaleidaGraph, Version 3.5	Synergy Software	Reading, USA
Paint Version 5.1	Microsoft	Redmond, USA
Paint.NET Version 3.5.5	Microsoft	Redmond, USA
Progressive Resolution Algorithm PRO Version 8.9.08	Varian Medical Systems	Helsinki, Finnland
SPSS Version 12.0.0	SPSS	Chicago, USA
Tests MS-DOS® Anwendung	Programmierer PD Dr. H. Wolff	Göttingen, Deutschland
Word Version 2000 9.0.2812	Microsoft	Redmond, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Patientenrekrutierung und Blutentnahmen (BE)

Die Patienten entstammten der CAO/ARO/AIO-04-Studie. Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen des Teilprojektes (TP) 6 „Toxizität, Pharmakogenomik“ der KFO 179. Die Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen wurde über die Vorgänge der CAO/ARO/AIO-04-Studie und der KFO 179 informiert und genehmigte diese. Die Patienten wurden adäquat aufgeklärt und willigten ein, an der CAO/ARO/AIO-04-Studie und den weiteren Untersuchungen der KFO 179 einschließlich der Untersuchungen des TP 6 teilzunehmen.

Es erfolgte im Rahmen der jährlichen NS die Entnahme von zwei 7,5-ml-Heparin-Monovetten venösen Blutes aus der Armvene der Patienten mittels Safety-Multifly®-Set mit Adapter zur weiteren Verarbeitung. Durch Verwendung der Heparin-Monovetten wurde die Koagulation des Blutes verhindert.

2.2.2 Diagnostik, multimodale Therapie und Nachsorgeuntersuchungen (NS)

Die Diagnostik wurde standardisiert durchgeführt. Die Diagnose des fortgeschrittenen Rektumkarzinoms wurde histologisch gesichert. Die Distanz vom Tumor zur Anokutanlinie betrug in der Messung mit dem starren Rektoskop maximal 12 cm. In der Endosonographie oder Computer– bzw. Magnetresonanztomographie stellte sich ein Rektumkarzinom im Stadium T3–4 oder N+ dar. Ein Ausschluss von Fernmetastasen erfolgte mittels Abdomensonographie und Röntgen–Thorax–Aufnahme.

Mögliche genotoxische Ereignisse (z. B. eine RTx) wurden im Vorfeld ausgeschlossen. Unter den Probanden zeigte keiner starken Alkohol- oder Zigarettenkonsum.

Arm-A- und Arm-B-Patienten wurden präoperativ mit einer Gesamtdosis von 50,4 Gy in 28 Fraktionen zu je 1,8 Gy an 5 Wochentagen bestrahlt (erste RTx an Tag 1 der CTx nach der ersten Oxaliplatingabe bzw. nach Beginn der 5-FU-Infusion; zur RTx: 2.2.2.1).

Arm-A-Patienten erhielten in der 1. (Tag 1 bis 5) und 5. (Tag 29 bis 33) Woche ihrer Therapie über 120 Stunden eine Dauerinfusion Fluorouracil (5–FU). Die Dosis betrug 1000 mg pro m^2 Körperoberfläche (KO) und Tag.

Arm-B-Patienten erhielten an Tag 1, 8, 22 und 29 eine zweistündige Dauerinfusion Oxaliplatin in 500 ml 5%iger Glucose (50 mg pro m^2 KO und Tag). An Tag 1 bis 14 und 22 bis 35 wurde 5–FU (250 mg pro m^2 KO und Tag) als Dauerinfusion appliziert.
Bei allen Patienten wurde nach einem freien Intervall von 4 bis 6 Wochen die Operation durchgeführt.
Vier Wochen nach der Operation wurde den Arm-A-Patienten 5-FU (500 mg pro m^2 KO und Tag) als Bolus über 2 bis 5 Minuten an Tag 1 bis 5, 29 bis 33, 57 bis 61 und 85 bis 89 verabreicht.
Den Arm-B-Patienten wurden 4 Wochen nach der Operation (entspricht Tag 1) Folinsäure (400 mg pro m^2 KO, zweistündige Dauerinfusion), Oxaliplatin (100 mg pro m^2 KO, zweistündige Dauerinfusion in 500 ml 5%iger Glucoselösung) und 5-FU (2400 mg pro m^2 KO, 46-stündige Dauerinfusion) verabreicht. Diese Kombination wurde an den Tagen 15, 29, 43, 57, 71, 85 und 99 wiederholt.
An die Therapie schloss sich eine 5-jährige Nachbeobachtungsphase (NS) mit jährlicher Vorstellung der Patienten an. Es wurde eine Anamnese bezüglich des Krankheitsverlaufs oder neuer Erkrankungen erhoben und eine allgemeine körperliche Untersuchung durchgeführt. Es erfolgte eine strahlentherapeutisch–spezifische Untersuchung mit den klassischen Nebenwirkungen im Bereich des Beckens als Schwerpunkt. Ebenso wurden Lebensqualität und Kontinenz der Patienten mittels spezieller Fragebögen dokumentiert. Im Rahmen der NS fanden auch die Blutentnahmen zur Gewinnung der Proben für diese Arbeit statt.

2.2.2.1 Bestrahlungstechnik

Die RTx erfolgte nach dem Studienprotokoll der CAO/ARO/AIO-04-Studie: Die Radiatio wurde mit einer Einzeldosis von 1,8 Gy im Referenzpunkt nach ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurement) 50 1x täglich und 5x wöchentlich in 28 Fraktionen über 5-6 Wochen bis zu einer Gesamtreferenzdosis von 50,4 Gy ausgeführt. Die Bestrahlung erfolgte mit hochenergetischen Photonen, vorzugsweise Linearbeschleuniger-Photonen >6 MeV. Die 95%-Isodose sollte das Zielvolumen umschließen, die Maximaldosis sollte die Referenzdosis um nicht mehr als 7% überschreiten. Das Bestrahlungsvolumen umfasste die Sakralhöhle, das gesamte Sakrum, die dorsalen Anteile von Blase und Prostata bzw. Vagina und die präsakralen und iliakal-kommunen Lymphknoten bis zum Promontorium (bei Lokalisation am Therapiesimulator Kontrastmittelfüllung von Blase und Rektum, fakultativ auch des Dünndarms). Die Bestrahlung erfolgte isozentrisch in

3- oder 4-Felder-Technik mit individuellen Absorbern. Die Patienten sollten in Bauchlage gelagert werden. Die Anwendung eines „belly-boards“ war wünschenswert. Patientenlagerung, Hautmarkierungen und Einstellungen am Gerät wurden fotodokumentiert. Folgende Vorgaben galten für die Feldgrenzen:

- An der oberen kranialen Feldgrenze liegt die Unterkante von Lendenwirbelkörper 5.
- Die kaudale Feldgrenze sitzt im Bereich der Sitzbeine bzw. bei tief sitzenden Tumoren circa 3-5 cm kaudal des Tumorunterrandes (Tumorunterrand <2 cm an Linea dentata: Einschluss des Analkanals).
- Die dorsale Feldgrenze schließt das Os sacrum ein.
- Die ventrale Feldgrenze befindet sich im Bereich der dorsalen Blasenhälfte und Prostata bzw. Scheidenhinterwand (mindestens 2 cm ventral der vorderen Tumorgrenze).
- Die laterale Feldgrenze liegt 1-2 cm lateral der Linea terminalis.

Die Bestrahlungsplanung und -optimierung erfolgte 3-D-gestützt. Die Schichtdicke im Planungs-CT betrug höchstens 1,0 cm, empfohlen wurden 0,5 cm. Vor der Bestrahlung waren alle Felder mit Individualkollimatoren am Therapiesimulator zu verifizieren. Ebenso war das Anfertigen von Verifikationsaufnahmen sämtlicher Bestrahlungsfelder in jeder Bestrahlungsserie und bei Feldänderungen notwendig.

2.2.2.1.1 3D-konformale Radiotherapie (3DCRT)

Bei der 3D-konformalen Bestrahlung (3DCRT, *3D conformal radiotherapy*) wurden die individuellen Zielvolumina mit dem Behandlungsplanungssystem „Eclipse“ definiert. Die Bestrahlungswinkel wurden zu 0°, 90° und 270° gesetzt. Die Photonenenergien betrugen bei 0° 6 MeV (Mega-Elektronenvolt), bei 90° und 270° 20 MeV. Mit Hilfe des Millennium-120-Multilamellenkollimators wurden die Bestrahlungsfelder hergestellt. Der Winkel des Kollimators wurde auf 0° und die Dosisrate auf 300 Monitoreinheiten pro Minute gesetzt. Zur Verbesserung der Planung wurden Keile von 45° oder 60° individuell bei den Patienten eingesetzt (Wolff et al. 2012).

2.2.2.1.2 Intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT)

Die Pläne zur intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT) wurden nach der Methode der dynamischen gleitenden Fenster (Chui et al. 1994) erstellt. Der Kollimatorwinkel betrug 0° und die 7 festgelegten Gantry-Winkel waren 0°, 51°, 103°, 154°, 206°, 257° und 309°. Die Behandlungsfelder wurden mit dem Programm „DVO (*dosis volume optimizer*)“ angepasst. Bei 0°, 51° und 309° wurden Photonen mit 6 MeV eingesetzt, bei 103°, 154°, 206° und 257° Photonen mit 20 MeV. Die Dosisrate betrug 500 Monitoreinheiten pro Minute (Wolff et al. 2012).

2.2.2.1.3 Volumetric Modulated Arc Therapy (VMAT)

Die VMAT(*volumetric modulated arc therapy*)-Pläne wurden mittels RapidArc®-Technologie mit dem „PRO(*progressive resolution algorithm*)-System“ erstellt. Das Behandlungsfeld eines einzelnen Bogens wurde in 177 Kontrollpunkte unterteilt um die Strahlenmodulation zu erreichen. Für jeden Kontrollpunkt veränderte sich die Blendenöffnung durch den Multilamellenkollimator mit dem Gantry-Winkel. Die Dosisrate variierte zwischen 0 und 600 Monitoreinheiten pro Minute und die Gantry-Rotation zwischen 0.0° und 4.8° pro Sekunde. Der Kollimator rotierte bei der Bestrahlung zwischen 15° und 45° (Wolff et al. 2012).

2.2.3 Herstellung von Nährlösung und Reagenzien

Für die Nährlosung wurden 52,15 g RPMI Trockenmedium mit 7,13 g Natriumhydrogencarbonat, 11,92 g HEPES, 12,5 g Glucose und 25 ml Penicillin/Streptomycin verwendet. Das Gemisch wurde mit bidestilliertem Wasser auf 5 l verdünnt. Die entstehende Lösung wurde steril filtriert (RPMI SF).

Fetales bovines Serum (FBS) wurde inaktiviert durch Inkubation im Wasserbad bei 56°C für 30 Minuten.

Die Nährlösung RPMI SF+10% FBS entstand durch Vermengen von 450 ml RPMI SF mit 50 ml FBS und wurde bei 4°C gelagert.

In die Leucosep™-Röhrchen wurden jeweils 3 ml der Biocoll-Reagenzlösung gegeben. Die Röhrchen wurden zwei Minuten bei 2400 Umdrehungen pro Minute (UpM) und

Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das Separationsmedium wanderte bei der Zentrifugation unter die poröse Barriere in den Röhrchen.

Das Trockenmedium vom PHA wurde in 5 ml bidestilliertem Wasser gelöst und lagerte dann bei 4°C.

Der Stock des Cytochalasin-B-(Cyt-B-)Mix hatte die Konzentration von 600 µg Cyt-B pro ml Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Lösung wurde bei 4°C in kristalliner Form gelagert und direkt vor Gebrauch bei RT verflüssigt.

2.2.4 Isolation der Lymphozyten und Proliferationsaktivierung mit PHA

12 ml vom venösen Blut der Patienten wurden mit 24 ml steriler 0,9%iger Kochsalzlösung in einem 50-ml-Röhrchen vermischt (Blut:Kochsalzlösung=1:2). In 6 präparierte Leucosep™-Röhrchen wurden je 6 ml des Gemisches gegeben. Es erfolgte eine Zentrifugation nach Dichtegradienten mit deaktivierter Zentrifugen-Bremse und 2400 UpM für 15 Minuten bei RT (Abbildung 7).

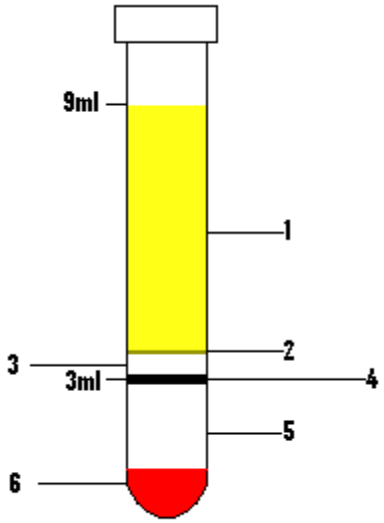

Abbildung 7: Resultat der Zentrifugation des 1:2 mit 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnten Vollbluts in Leucosep™-Röhrchen (Gebrauchsanleitung Leucosep™-Röhrchen Art. Nr. 163290, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
(1: Blutplasma; 2: Interphase (Lymphozyten und periphere mononukleäre Zellen (PBMCs)); 3: Biocoll Trennlösung; 4: poröse Barriere; 5: Biocoll Trennlösung; 6: Niederschlag aus Erythrozyten und Granulozyten)

Die Fraktion des Bluplasmas wurde mit einer serologischen Pipette bis auf etwa 5-10 mm über der Interphase abgenommen und verworfen. Der Abstand von 5-10 mm verhinderte eine Kontamination der Interphase mit Blutplättchen. Der restliche Überstand über der Barriere wurde mittels Pipette aus allen 6 Leucosep™-Röhrchen in ein 50-ml-Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit RPMI SF+10% FBS auf 50 ml aufgefüllt. Die 50 ml Lösung wurden mit einer serologischen Pipette in 250-ml-Gewebekulturflaschen überführt. Diese wurden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Es folgte die Zugabe von 500 µl der Lösung von PHA mit einer Eppendorf-Pipette in die Gewebekulturflaschen zur Proliferationsaktivierung der Lymphozyten. Die Zugabe des Mitogens zur 50-ml-Lösung erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei den einzelnen Proben, so dass eine zeitliche Flexibilität hinsichtlich der Planung der nächsten Verarbeitungsschritte möglich wurde. Die Zugabe des PHA erfolgte frühestens direkt nach Isolation der Lymphozyten und spätestens nach 10stündiger Inkubation der Gewebekulturflaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Lektin PHA über 44 Stunden bei 37°C und 5% CO_2.

2.2.5 Zytokinesearrest durch Cytochalasin B (Cyt-B)

Nach Ablauf der 44 Stunden Inkubation wurde die Lösung in den Gewebekulturflaschen mit einer serologischen Pipette resuspendiert und in ein 50-ml-Röhrchen überführt. Es wurden einige Tropfen mit einer Pasteurpipette entnommen und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Ein Tropfen aus der Pipette wurde am Rand des Deckglases appliziert und gelangte durch Kapillarkräfte in die Zählkammer. Die Zellen wurden ungefärbt unter einem inversen Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Es wurde zweimalig die Anzahl der Lymphozyten in 100 nl bestimmt. Daraus ergab sich durch Multiplikation mit $5x10^5$ die Gesamtzahl der Lymphozyten in der 50-ml-Lösung.

Die 50-ml-Lösung wurde bei RT und 1200 UpM für acht Minuten zentrifugiert. Es entstand ein Bodensatz der zellulären Elemente. Vom Überstand wurden 40 ml mit serologischer Pipette entfernt und verworfen. In den verbleibenden 10 ml wurde der Bodensatz resuspendiert. Das Gemisch wurde in eine 50-ml–Gewebekulturflasche überführt.

Mit einer Eppendorf–Pipette wurden 75 µl des Cyt–B–Mix in die Gewebekulturflasche gegeben. Das Gefäß wurde 28 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

2.2.6 Verdünnung, Cytospin® und Färbung

Nach der Inkubation wurde die 10-ml-Lösung im Gefäß resuspendiert. Sie wurde mit einer serologischen Pipette in ein 50-ml–Röhrchen transferiert. Dieses wurde für acht Minuten bei 1200 UpM zentrifugiert, so dass ein Bodensatz der zellulären Elemente entstand.
Es erfolgte die Division der Gesamtzahl der Lymphozyten in 10 ml Lösung (z. B. 2.100.000) durch 300.000 (Ziel der Verdünnung, pro ml). Je nach Ergebnis (z. B. 7 ml) wurde Überstand verworfen (z. B. 10 ml–7 ml=3 ml) und eine Lösung mit 300.000 Zellen pro ml erzeugt. Zum Erzeugen einer Verdünnung mit 150.000 Zellen pro ml wurde in ein 10-ml–Röhrchen 1 ml RPMI SF+10% FBS pipettiert. Es wurde 1 ml der Lymphozyten–Lösung mit 300.000 Zellen pro ml hinzugegeben. Durch die 1:1–Verdünnung enthielt das zweite Gefäß 150.000 Lymphozyten pro ml.
Beim Cytospin® wurden 5 Trichter (Cytofunnels®) mit je 100 µl der ersten Verdünnung (300.000 Zellen pro ml, also 30.000 pro Trichter) und 5 Trichter mit je 100 µl der zweiten Verdünnung (15.000 Zellen pro Trichter) befüllt. 10 Objektträger wurden beschriftet mit Patientennummer, Abnahmepunkt, Datum der Zentrifugation und jeweiliger Zellzahl (30.000 oder 15.000). Die Trichter wurden mit je einer Filterkarte und einem Objektträger in den Probekammern installiert und für 5 Minuten bei 1500 UpM zentrifugiert. Insgesamt entstanden aus einer Blutprobe 5 Objektträger mit einem Spot mit 30.000 Zellen und 5 Objektträger mit einem Spot mit 15.000 Zellen.
Die Objektträger wurden nach Entnahme aus dem Cytospin® für einige Minuten an Raumluft getrocknet und für 10 Minuten in einem Gefäß mit Methanol inkubiert.
Anschließend erfolgte die Anfärbung mittels Diff-Quik®-Färbeverfahren, einer Schnellfärbung. Es wurden die Lösungen und Diff–Quik II® verwendet. Diff–Quik I® ist eosinophil und enthält Xanthen–Farbstoff, pH–Puffer und Natriumazid und Diff–Quik II® besitzt basophile Eigenschaften und enthält Thiazin–Farbstoff und einen pH–Puffer.
Jeder Objektträger wurde fünfmal je 1 Sekunde in Diff–Quik I® getaucht, dann fünfmal in Diff–Quik II® für je 1 Sekunde. Die Objektträger wurden einzeln durch Schwenken in destilliertem Wasser gereinigt, einige Minuten an der Luft getrocknet und in Präparatekästen archiviert.

2.2.7 Auszählung der Objektträger mittels Mikroskop

Die Objektträger wurden unter dem Lichtmikroskop mit 100facher Vergrößerung unter Immersionsöl betrachtet. Mit der MS–DOS®-Anwendung „Tests“ wurden folgende Merkmale von den 10 Objektträgern pro Blutentnahme (BE) jeweils gezählt bis 1.000 BLZ registriert waren:

- Tetranukleäre Zellen ohne Mikrokern (MK) oder nukleoplasmatische Brücke (NPB)
- Tetranukleäre Zellen mit einem oder mehreren MK und/oder NPB
- Trinukleäre Zellen ohne MK oder NPB
- Trinukleäre Zellen mit einem oder mehreren MK und/oder NPB
- Binukleäre Lymphozyten (BLZ) insgesamt
- BLZ mit einem MK
- BLZ mit zwei MK
- BLZ mit drei MK
- BLZ mit vier oder mehr MK
- BLZ mit NPB

Für die Bestimmung des NDI und des NDCI von den 10 Objektträgern pro BE wurden jeweils gezählt:

1) Mononukleäre Zellen
2) BLZ
3) Trinukleäre Zellen
4) Tetranukleäre Zellen
5) Apoptosen
6) Nekrosen

Die Charakterisierung dieser Zellen erfolgte unabhängig von MK und NPB bis die Summe aus 1) bis 4) mindestens 500 Zellen betrug.

Zur Auswahl von BLZ wurden folgende Kriterien (Abbildung 8) beachtet (Fenech 2000):

a) BLZ müssen 2 Kerne enthalten.
b) Die Kernmembranen sind nicht beschädigt.
c) Beide Kerne befinden sich innerhalb des gleichen Zytoplasmas.
d) Beide Nuklei einer BLZ sind etwa gleich groß.
e) Beide Kerne haben ein nahezu gleiches Chromatinmuster und eine ähnliche Helligkeit.

f) Beide Kerne einer BLZ können sich berühren. Dabei sind die Kernmembranen gut voneinander zu unterscheiden. Die beiden Kerne kommen nicht zu Teilen übereinander zu liegen.
g) Beide Kerne dürfen durch eine Kernbrücke (NPB) verbunden sein. Die NPB umfasst von der Breite her nicht mehr als 1/4 des Kerndurchmessers.
h) BLZ umschließt eine klar sichtbare, unbeschädigte und von umliegenden Zellen abgrenzbare Zellmembran.

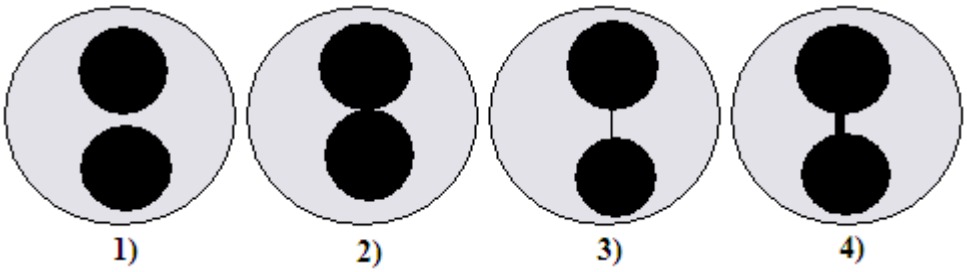

Abbildung 8: Schematische Darstellung von BLZ unter dem Lichtmikroskop im Rahmen der angewandten Methode (Fenech 2000, S.85)
(1: BLZ mit frei liegenden Kernen; 2: die Zellkerne der BLZ berühren sich; 3: Nukleoplasmabrücke (NPB) geringen Durchmessers zwischen den beiden Kernen; 4: Kerne sind durch eine breitere NPB verbunden)

Weitere Bedingungen (Abbildung 9) für die Bestimmung der Anzahl der MK (Fenech 2000):

a) Das Verhältnis des Durchmessers eines MK zum Kern des BLZ beträgt zwischen 1:16 und 1:3.
b) MK sind in ähnlicher Weise wie der zuzuordnende Zellkern angefärbt.
c) MK besitzen keine Einziehungen und sind somit von färbungsbedingten Artefakten abgrenzbar.
d) Der Zellkern besitzt keine Plasmabrücke zu einem MK.
e) Der Zellkern kann einen MK berühren, überlappt jedoch nicht mit ihm.
f) Membranen des Zellkerns und des MK sind klar voneinander abgrenzbar.

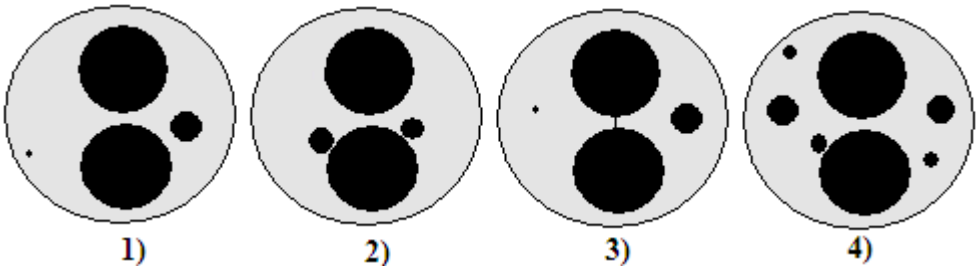

Abbildung 9: Schematische Beispiele zur Darstellung von MK unter dem Lichtmikroskop (Fenech 2000, S.86)
(1: BLZ mit zwei MK, deren Durchmesser 1/3 (rechts) bzw. 1/16 (links) des Durchmessers des Kerns betragen; 2: Zwei MK berühren den unteren Kern ohne zu überlappen; 3: BLZ mit NPB und zwei MK; 4: Zelle mit fünf MK unterschiedlicher Größe, wobei ein MK den unteren Kern berührt)

Zur sicheren Auswertung mussten zelluläre Strukturen erkannt werden, die MK ähnelten aber nicht als solche gewertet werden durften (Abbildung 10).

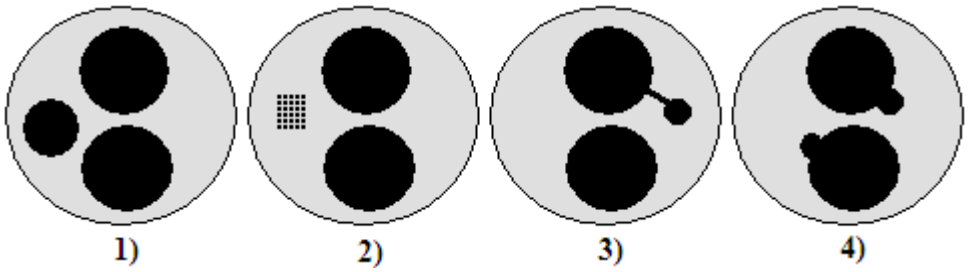

Abbildung 10: Zelluläre Strukturen, die MK ähneln, jedoch nicht als solche gewertet werden dürfen (Fenech 2000, S. 86)
(1: Trinukleäre Zelle (der Durchmesser des mutmaßlichen MK beträgt mehr als 1/3 dessen der größeren Kerne); 2: dichte zytoplasmatische Tüpfelung; 3: Kernanteile, die als schmale Ausstülpung des oberen Kerns imponieren; 4: Blasen mit einer Verbindung zu beiden Kernen des BLZ)

Abbildung 11 zeigt beispielhaft verschiedene BLZ, die bei der Experimentiertechnik unter dem Mikroskop gesehen wurden.

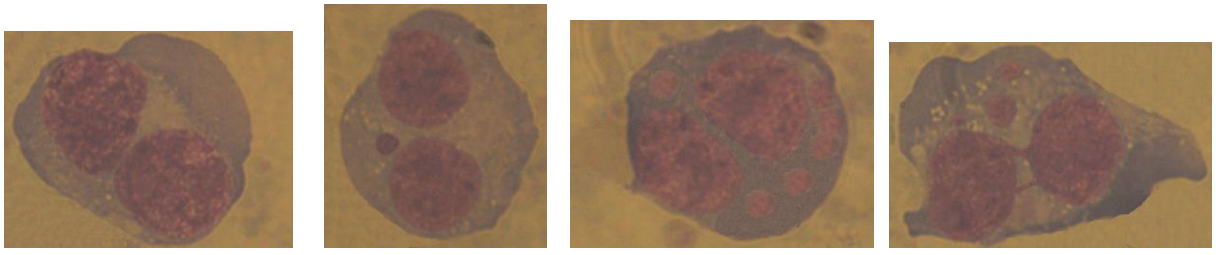

Abbildung 11: Beispiele für BLZ (Fotografien: Canon PowerShot A640)
(1: BLZ ohne morphologisches Korrelat eines zytogenetischen Schadens; 2: BLZ mit einem MK; 3: BLZ mit multiplen MK; 4: BLZ mit Mikrokernen und Brücke)

2.2.8 Statistische Analysen

Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Daten (KaleidaGraph) wurde zur Prüfung eines statistischen Unterschiedes der Werte für MK, NPB, NDI und NDCI bei den einzelnen BE (Blutentnahmen) verwendet. Die Prüfung erfolgte für die MK-Ausbeute (BE 1y („1 year“: NS nach 1 Jahr) gegen BE 2y („2 years“: NS nach 2 Jahren), vor RTx gegen BE 1y, vor RTx gegen BE 2y, am Ende der RTx gegen BE 1y, am Ende der RTx gegen BE 2y), für die Anzahl der NPB (BE 1y gegen BE 2y), für NDI (BE 1y gegen BE 2y, vor RTx gegen BE 1y, vor RTx gegen BE 2y), für NDCI (BE 1y gegen BE 2y) und für NDI gegen NDCI (jeweils bei BE 1y und BE 2y).

Mittels nicht-parametrischer Korrelationsanalyse nach Spearman (SPSS) erfolgte die Prüfung eines Zusammenhangs zwischen MK-Ausbeuten einzelner Patienten bei BE 1y und BE 2y. Bei nur geringer Abweichung von einer Normalverteilung der Werte wurde zusätzlich die parametrische Korrelationsanalyse nach Pearson (SPSS) durchgeführt.

Mittels Jonckheere-Terpstra-Test (SPSS) wurde ein Zusammenhang zwischen Spättoxizität und MK-Ausbeuten geprüft. Die Analyse wurde für die Organe Haut, Rektum und Blase und für die Gesamttoxizität durchgeführt. Das Kollektiv wurde bei BE 1y und BE 2y in 5 Gruppen (Grade 0 bis 4 nach LENT/SOMA; 3 Gruppen für Haut: nur Toxizität Grad 0-2) eingeteilt.

Mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Rang-Summen-Test für ungepaarte Daten (SPSS) wurde für das Organ Blase geprüft, ob Patienten mit Spättoxizität (≥Grad 1) höhere MK-Ausbeuten zeigten als Patienten ohne Spättoxizität.

Mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Rang-Summen-Test für ungepaarte Daten (KaleidaGraph) wurde ein statistischer Unterschied zwischen MK-Ausbeuten bei männlichen und weiblichen Probanden (jeweils bei BE 1y und BE 2y) und zwischen MK-Ausbeuten und Bestrahlungsart (nur BE 1y) geprüft.

Mittels nicht-parametrischer Korrelationsanalyse nach Spearman (SPSS) erfolgte die Prüfung eines Zusammenhangs zwischen MK-Ausbeuten und Patientenalter, Zeitpunkt der BE (Zeitspanne Operation bis BE 1y und BE 2y sowie Ende der adjuvanten CTx bis BE 1y und BE 2y) und Größe der Bestrahlungsvolumina (Rektumvolumen, Rektumzielvolumen).

Die statistischen Analysen wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Markus Schirmer (Abteilung Klinische Pharmakologie) und Dr. Klaus Jung (AG Klinische Studien) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Das Kollektiv umfasste 48 Patienten mit Rektumkarzinom im fortgeschrittenen Stadium, darunter 20 Frauen und 28 Männer (Tabelle 13 und Tabelle 14). Das mittlere Patientenalter bei Therapiebeginn betrug 62,5 Jahre (Maximum 82 Jahre, Minimum 41 Jahre). 30 Patienten wurden nach Arm A therapiert, 18 nach Arm B. 43 Blutentnahmen (BE) erfolgten 1 Jahr nach Ende der Therapie, 31 nach 2 Jahren. cUICC-Stadium (initiales klinisches Staging) und ypUICC-Stadium (Operationsresektat nach neoadjuvanter RCT) sind angegeben. Da einige Patienten nicht zu den NS erschienen oder Untersuchungen zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch ausstanden, fehlen einige Werte für BE 1y und BE 2y.

Tabelle 13: Eigenschaften der Studienpatienten des Arms A

Patient	Alter	Geschlecht	cUICC-Stadium	ypUICC- Stadium	BE 1y	BE 2y
1	61	m	III	III		x
2	54	m	II	0		x
3	53	w	II	I	x	x
4	60	m	III	III	x	x
5	70	w	III	II	x	x
6	44	m	III	0	x	x
7	59	m	III	II	x	x
8	80	m	III	III	x	x
9	72	w	III	II	x	x
10	72	m	III	IV	x	x
11	62	m	II	I		x
12	76	w	II	I	x	x
13	63	m	II	II	x	x
14	71	m	III	0	x	x
15	82	m	III	III	x	
16	77	w	III	III	x	x
17	41	m	III	I	x	x
18	43	m	II	I	x	x
19	56	w	III	III	x	x
20	67	w	III	II	x	x
21	55	w	III	III	x	
22	72	w	III	II	x	x
23	61	m	III	III	x	x
24	73	w	III	III	x	
25	69	m	II	III	x	
26	58	w	III	III	x	
27	75	m	III	III	x	
28	62	m	II	IV	x	
29	72	m	III	III	x	
30	71	w	III	III	x	

(BE 1y bzw. 2y: Blutentnahme bei NS nach 1 bzw. 2 Jahr(en); x: vorhanden)

Tabelle 14: Eigenschaften der Studienpatienten des Arms B

Patient	Alter	Geschlecht	cUICC-Stadium	ypUICC- Stadium	BE 1y	BE 2y
31	46	w	III	0		x
32	59	w	III	III	x	x
33	48	m	III	II	x	x
34	62	m	III	IV	x	
35	70	m	II	II	x	x
36	64	w	III	II	x	x
37	68	m	III	II	x	x
38	54	m	III	I	x	x
39	67	m	III	II		x
40	76	w	III	III	x	x
41	41	w	III	I	x	x
42	57	m	III	0	x	
43	73	w	III	0	x	
44	68	m	III	I	x	
45	59	w	IV	IV	x	
46	67	m	IV	IV	x	
47	60	m	III	II	x	
48	51	w	III	III	x	

(BE 1y bzw. 2y: Blutentnahme bei NS nach 1 bzw. 2 Jahr(en); x: vorhanden)

3.2 Mikronukleustest und Spättoxizität

3.2.1 Mikronukleustest

3.2.1.1 Mikrokerne (MK)

Die Mikrokerne (MK) in den binukleären Lymphozyten (BLZ) pro 1000 BLZ nahmen von Blutentnahme (BE) 1y zu BE 2y hin statistisch signifikant ab ($p<0,0001$; Abbildung 12, Tabelle 18 und Tabelle 19 im Anhang). Der Median betrug 0,076 für BE 1y (0,03-0,203). Das untere Quartil lag bei 0,0645 und das obere bei 0,0995 (relative Standardabweichung 44,1%). Der Median betrug 0,038 für BE 2y (0,016-0,085). Das untere Quartil lag bei 0,028 und das obere bei 0,047 (relative Standardabweichung 44,6%).

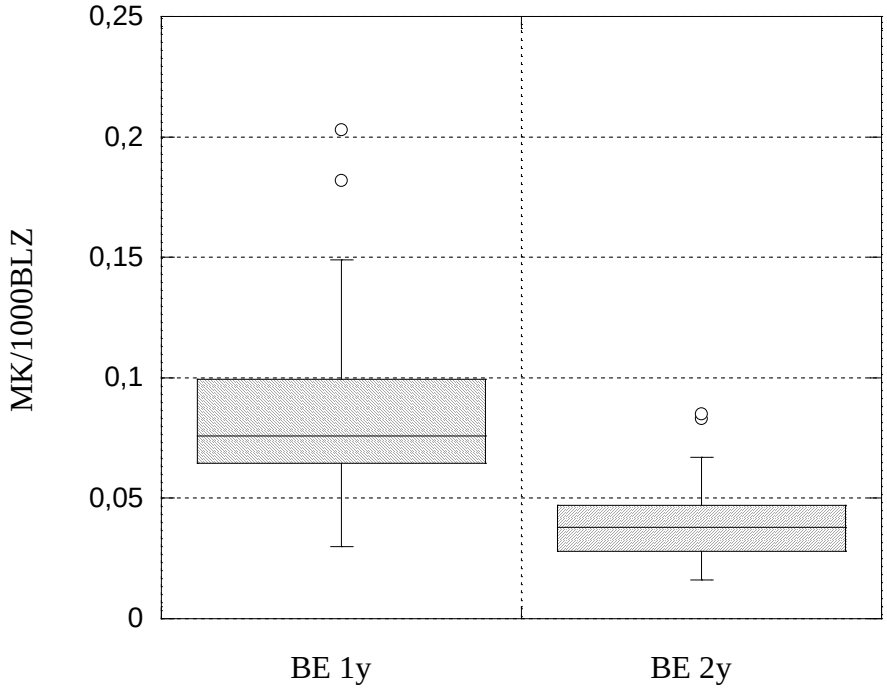

Abbildung 12: Mikrokerne pro 1000 BLZ bei BE 1y und BE 2y
(Punkte: Ausreißer; oberer und unterer Whisker: 95%- und 5%-Quantile; Box: oberes und unteres Quartil sowie Median)

Die Korrelationsanalyse zur Prüfung eines Zusammenhangs zwischen MK-Ausbeuten der einzelnen Patienten bei BE 1y und BE 2y ergab einen statistisch signifikanten Zusammenhang (Abbildung 13). Der Spearman'sche Rang-Korrelations-Koeffizient ergab sich zu r_s=0,677 (p<0,01) und der Pearson-Koeffizient zu r=0,633 (p=0,001; r^2=0,401).

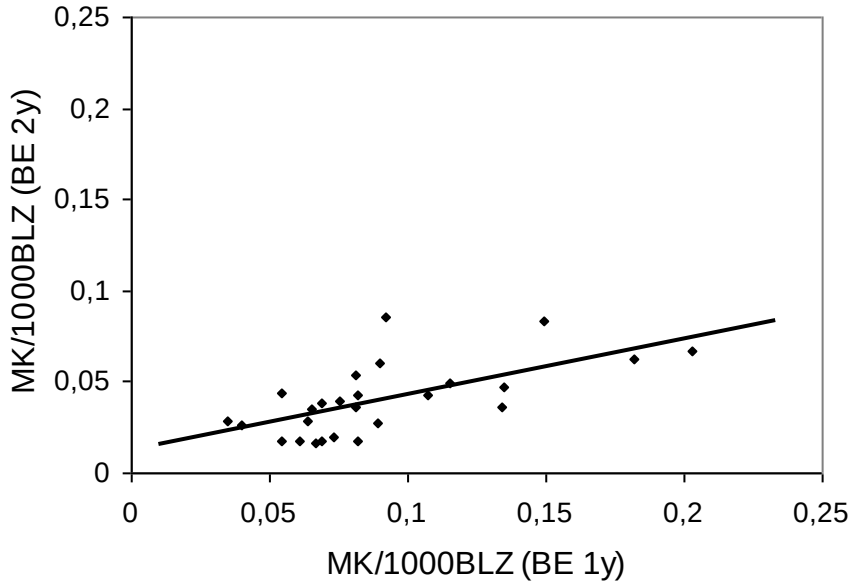

Abbildung 13: Korrelation zwischen MK-Ausbeuten einzelner Patienten bei BE 1y und BE 2y

3.2.1.2 Nukleoplasmatische Brücken (NPB)

Die NPB pro 1000 BLZ zeigten im zeitlichen Verlauf der BE eine statistisch signifikante Abnahme ($p<0,0001$; Abbildung 14, Tabelle 18 und Tabelle 19 im Anhang). Der Median betrug 0,007 für BE 1y (0,003-0,018). Das untere Quartil lag bei 0,005 und das obere bei 0,0095. Der Median betrug 0,004 für BE 2y (0,001-0,01). Das untere Quartil lag bei 0,0035 und das obere bei 0,005.

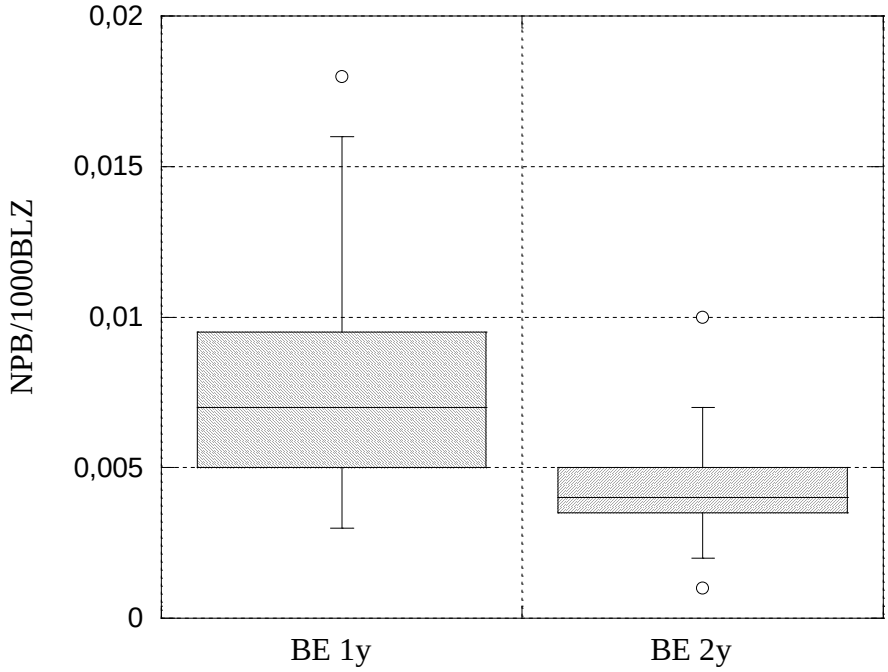

Abbildung 14: Nukleoplasmatische Brücken pro 1000 BLZ bei BE 1y und BE 2y
(Punkte: Ausreißer; oberer und unterer Whisker: 95%- und 5%-Quantile; Box: oberes und unteres Quartil sowie Median)

3.2.1.3 NDI und NDCI

Der NDI stieg im Mittel von BE 1y zu BE 2y (keine statistische Signifikanz; p=0,05; Abbildung 15, Tabelle 18 und Tabelle 19 im Anhang). Der Median betrug 1,44 für BE 1y (1,10-1,88). Das untere Quartil lag bei 1,355 und das obere bei 1,59. Der Median betrug 1,58 für BE 2y (1,12-1,76). Das untere Quartil lag bei 1,45 und das obere bei 1,635.

Der NDCI stieg im Mittel von BE 1y zu BE 2y (statistische Signifikanz; p=0,03; Abbildung 15, Tabelle 18 und Tabelle 19 im Anhang). Der Median betrug 1,30 für BE 1y (1,07-1,67). Das untere Quartil lag bei 1,21 und das obere bei 1,39. Der Median betrug 1,38 für BE 2y (1,11-1,64). Das untere Quartil lag bei 1,305 und das obere bei 1,455.

Der NDCI nahm signifikant (jeweils p<0,0001) niedrigere Werte als der NDI bei BE 1y (Median 1,30 vs. 1,44) und BE 2y (Median 1,38 vs. 1,58) an.

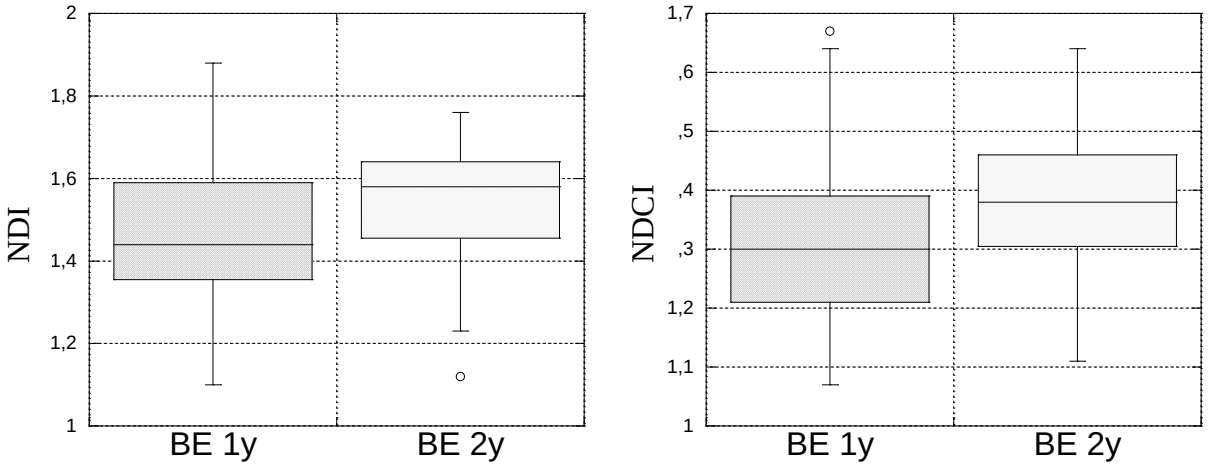

Abbildung 15: NDI und NDCI bei BE 1y und BE 2y
(Punkte: Ausreißer; oberer und unterer Whisker: 95%- und 5%-Quantile; Box: oberes und unteres Quartil sowie Median)

3.2.2 Spättoxizität

Bei 47 der 48 Patienten wurde die Spättoxizität nach LENT/SOMA-Kriterien ermittelt (Abbildung 16 und Tabelle 20 im Anhang).

Bei 44 Patienten trat keine Spättoxizität im Bereich der Haut auf (Grad 0). 2 Patienten hatten eine Toxizität 1. Grades, 1 Patient Toxizität 2. Grades.

Im Bereich des Rektums hatten 37 Patienten Spättoxizität Grad 0, 3 Patienten Toxizität 1. Grades, 5 Patienten Toxizität 2. Grades, 1 Patient Toxizität 3. Grades und 1 Patient Toxizität Grad 4.

Toxizität Grad 0 wurde für die Blase bei 36 Patienten dokumentiert, Grad 1 bei 3 Patienten, Grad 2 bei 1 Patienten, Grad 3 bei 5 Patienten und Grad 4 bei 2 Patienten.

Bei einigen Patienten trat als Spätnebenwirkung eine Enteritis auf (zweimal 1. Grades, zweimal 2. Grades und einmal 3. Grades). Bei einem Patienten trat Nephrotoxizität (Grad 2) im Rahmen der RCT auf.

Insgesamt trat bei 24 Patienten keine Toxizität auf, bei 8 Patienten betrug die größte Toxizität Grad 1, bei 6 Patienten Grad 2, bei 6 Patienten Grad 3 und bei 3 Patienten Grad 4.

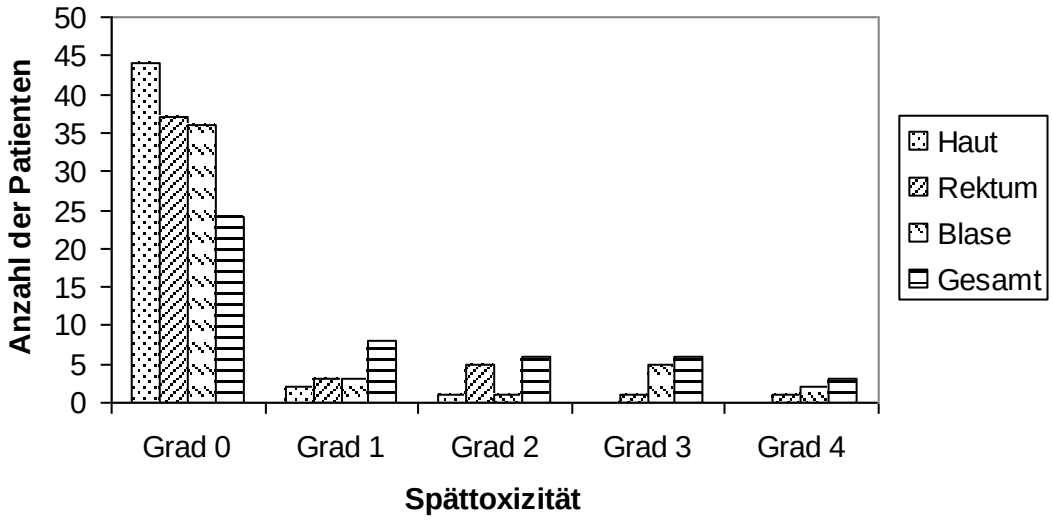

Abbildung 16: Spättoxizität nach einzelnen Organsystemen
(Grade nach LENT/SOMA-Kriterien: 1.2.1.1.2 und Tabelle 15 bis Tabelle 17 im Anhang)

3.3 Korrelation von Spättoxizität und zytogenetischen Schäden

Es wurde geprüft, ob bei Patienten mit einem höheren Grad der Spättoxizität zum Zeitpunkt der NS höhere MK-Ausbeuten vorlagen als bei Patienten mit Toxizität geringeren Grades. Die Toxizität wurde einzeln pro Organ und insgesamt (höchstgradige Toxizität eines einzelnen Organs) betrachtet (Abbildung 17 und Abbildung 18).

Es bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang für die Hauttoxizität (p=0,29 für BE 1y und p=0,50 für BE 2y). Die Analyse zeigte keinen signifikanten Zusammenhang für die Rektumtoxizität (p=0,62 für BE 1y und p=0,69 für BE 2y). Für die Gesamttoxizität zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang (p=0,56 für BE 1y und p=0,83 für BE 2y).

Der Test zeigte für die Blasentoxizität einen statistisch signifikanten Zusammenhang bei BE 1y (p=0,025), jedoch keinen bei BE 2y (p=0,45). Es konnte für BE 1y ein signifikanter statistischer Unterschied (p<0,01) zwischen MK-Ausbeuten bei Patienten ohne Spättoxizität (Grad 0) und Patienten mit Spättoxizität (≥Grad 1) gezeigt werden.

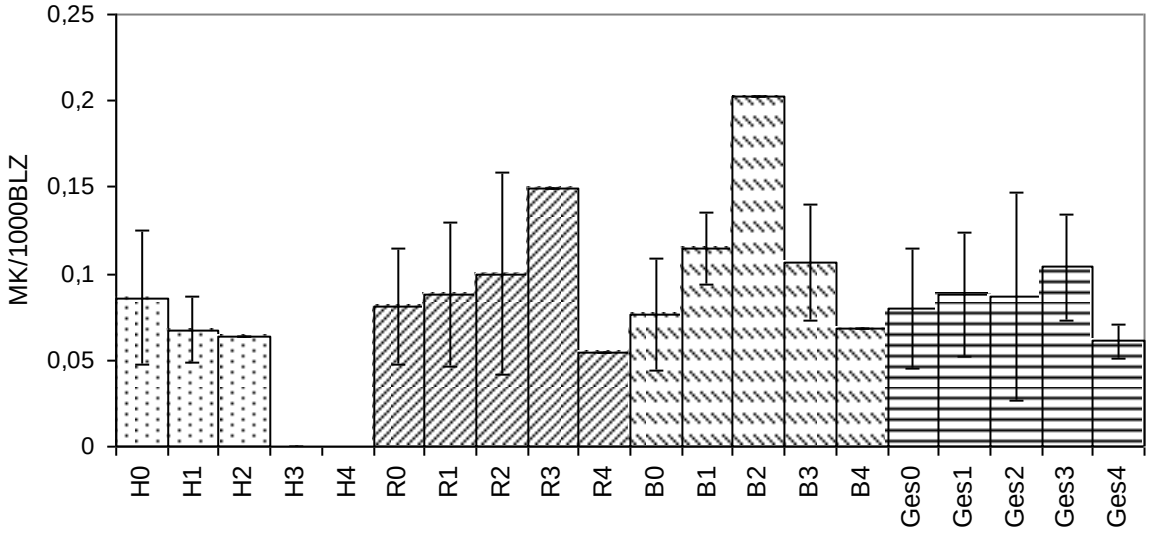

Abbildung 17: Spättoxizität und mittlere Anzahl der Mikrokerne bei BE 1y
(H0 bis H4: Toxizität der Haut, R0 bis R4: Toxizität beim Rektum, B0 bis B4: Toxizität der Blase, Ges0 bis Ges4: Gesamttoxizität; Fehlerindikator zeigt eine Standardabweichung; Grade nach LENT/SOMA-Kriterien: 1.2.1.1.2 und Tabelle 15 bis Tabelle 17 im Anhang)

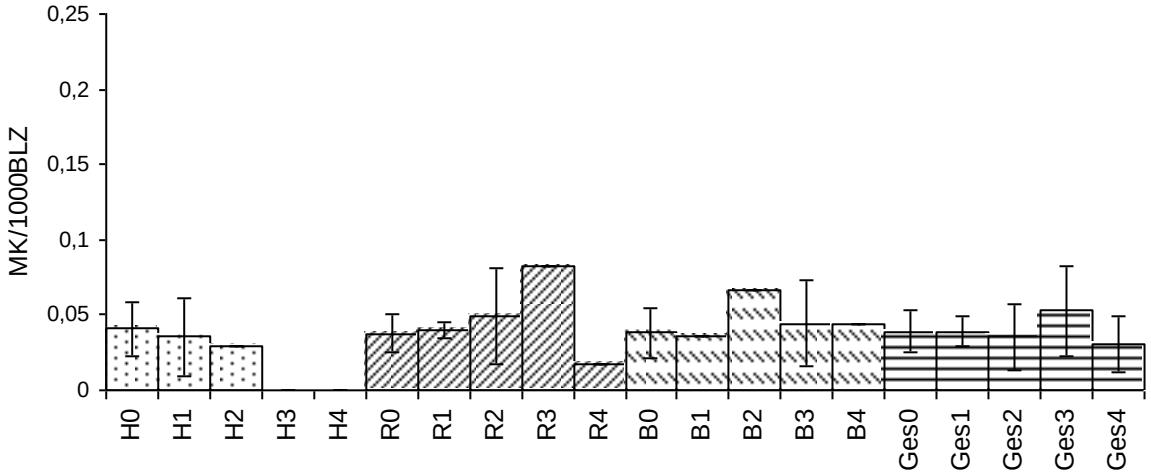

Abbildung 18: Spättoxizität und mittlere Anzahl der Mikrokerne bei BE 2y
(H0 bis H4: Toxizität der Haut, R0 bis R4: Toxizität beim Rektum, B0 bis B4: Toxizität der Blase, Ges0 bis Ges4: Gesamttoxizität, Fehlerindikator zeigt eine Standardabweichung; Grade nach LENT/SOMA-Kriterien: 1.2.1.1.2 und Tabelle 15 bis Tabelle 17 im Anhang)

3.4 Einfluss weiterer Faktoren auf die Ergebnisse des MNT

3.4.1 Zeitpunkt der Blutentnahme

Die BE erfolgten im Rahmen der NS bei einzelnen Patienten in unterschiedlichem zeitlichen Abstand zur vorherigen Therapie. Die Therapiesequenz bestand aus neoadjuvanter RCT, Operation (4-6 Wochen nach Ende der RCT) und adjuvanter CTx (Beginn 4 Wochen nach Operation). Die Patienten erhielten alle ihren ersten Nachsorgetermin im Abstand von 1 Jahr zum Ende der neoadjuvanten RCT. Der Grund für verschiedene zeitliche Abstände der BE zur CTx war z. B. ein vorzeitiger Abbruch der adjuvanten CTx aufgrund intolerabler Toxizitäten oder nach Patientenwunsch. Gründe für verschiedene zeitliche Abstände zu Operation und CTx waren z. B. individuelle Bedürfnisse der Patienten, welche zur Verschiebung der Nachsorgetermine führten.

Die Korrelationsanalyse zeigte keine statistische Abhängigkeit der MK-Ausbeuten vom zeitlichen Abstand zwischen Operation und BE (BE 1y: minimal 300 Tage, maximal 524 Tage; BE 2y: minimal 459 Tage, maximal 896 Tage; Abbildung 19). Für BE 1y ergab sich der Spearman'sche Rang-Korrelations-Koeffizient zu r_s=0,16 (p=0,30) und für BE 2y zu r_s=0,03 (p=0,88).

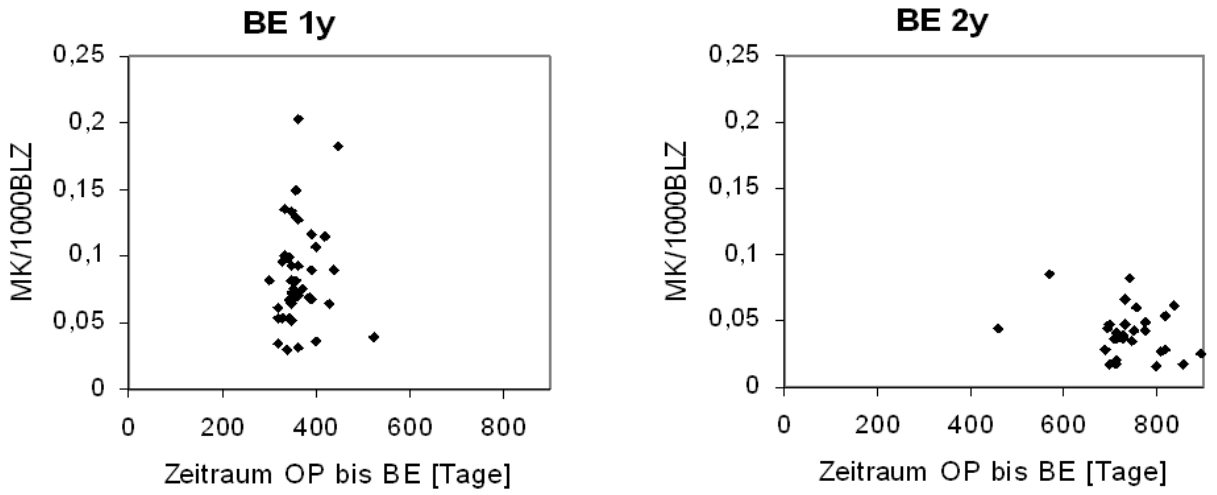

Abbildung 19: MK-Ausbeuten in Abhängigkeit vom Zeitraum zwischen Operation und BE

Die Korrelationsanalyse zeigte keine statistische Abhängigkeit der MK-Ausbeuten vom Abstand zwischen Ende der adjuvanten CTx und BE (BE 1y: minimal 141 Tage, maximal 361 Tage; BE 2y: minimal 302 Tage, maximal 733 Tage; Abbildung 20). Für BE 1y ergab sich der Spearman'sche Rang-Korrelations-Koeffizient zu r_s=0,005 (p=0,98) und für BE 2y zu r_s=0,19 (p=0,31).

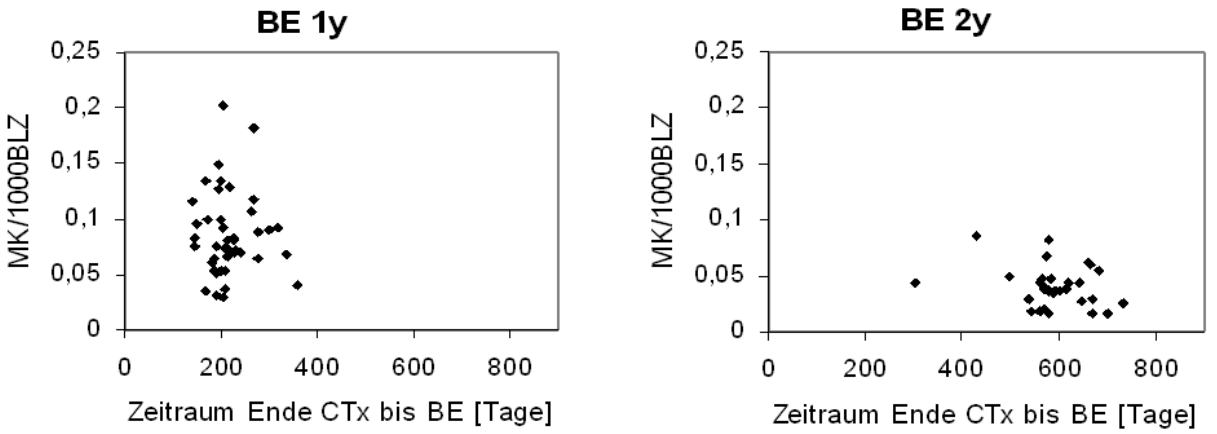

Abbildung 20: MK-Ausbeuten in Abhängigkeit vom Zeitraum zwischen Ende der CTx und BE

3.4.2 Alter und Geschlecht

Das mittlere Patientenalter betrug bei BE 1y 63,5 Jahre (Minimum: 41 Jahre, Maximum: 82 Jahre) und bei BE 2y 61,5 Jahre (Minimum: 41 Jahre, Maximum: 80 Jahre). Die Korrelationsanalyse zeigte keine statistische Abhängigkeit der MK-Ausbeuten vom Patientenalter (Abbildung 21). Für BE 1y ergab sich der Spearman'sche Rang-Korrelations-Koeffizient zu r_s=0,24 (p=0,12) und für BE 2y zu r_s=0,28 (p=0,13).

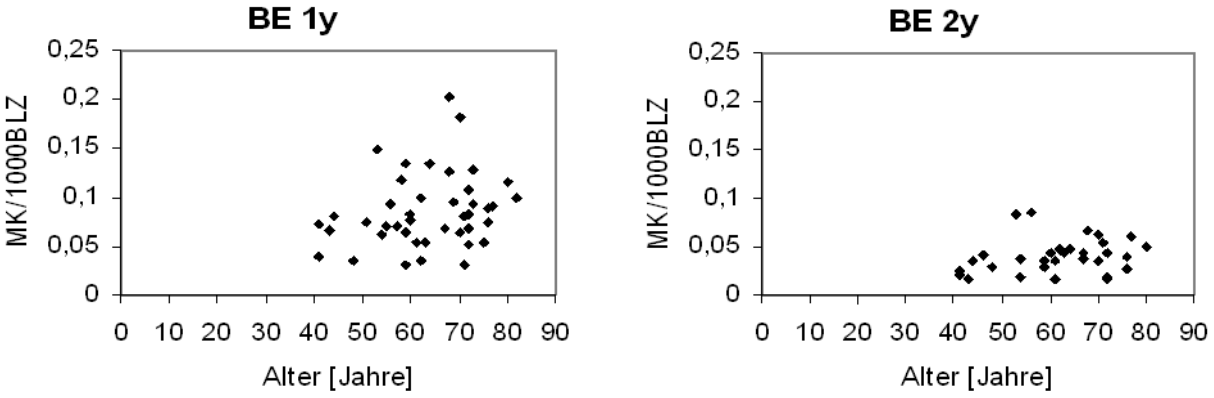

Abbildung 21: MK-Ausbeuten in Abhängigkeit vom Alter

Die MK-Ausbeuten waren bei BE 1y und BE 2y bei Frauen höher als bei Männern. Bei BE 1y bestand ein statistisch signifikanter Unterschied (p=0,03; 19 Frauen: im Mittel 0,096; 24 Männer: im Mittel 0,077; MK-Ausbeute bei Frauen 25% höher). Bei BE 2y bestand kein signifikanter Unterschied (p=0,19; 13 Frauen: im Mittel 0,046; 18 Männer: im Mittel 0,036; MK-Ausbeute bei Frauen 28% höher).

3.4.3 Bestrahlungsart und Bestrahlungsvolumina

Bei der Prüfung eines Zusammenhangs zwischen Bestrahlungsart (Tabelle 21 im Anhang) und MK-Ausbeuten bestand bei BE 1y kein signifikanter Unterschied (p=0,11) zwischen Patienten, die 3D-konformal bestrahlt wurden (37 Patienten, im Mittel 0,088) und Patienten, bei denen eine andere Bestrahlungsart (IMRT, VMAT, VMAT und 3DCRT) angewandt wurde (6 Patienten, im Mittel 0,068). Für BE 2y konnte der Zusammenhang nicht geprüft werden, da alle Patienten mit dieser Blutentnahme 3D-konformal bestrahlt wurden.
Die Korrelationsanalyse wurde durchgeführt für die MK-Ausbeute in Abhängigkeit vom Rektumzielvolumen bzw. vom bestrahlten Rektumvolumen (Tabelle 21 im Anhang). Sie

zeigte keine Korrelation zwischen MK-Ausbeuten und Rektumzielvolumen (Abbildung 22; BE 1y: r_s=0,07 (p=0,64); BE 2y: r_s=0,09 (p=0,63)). Es bestand keine Korrelation zwischen Größe des bestrahlten Rektumvolumens und MK-Ausbeuten (Abbildung 23; BE 1y: r_s=0,16 (p=0,31); BE 2y: r_s=0,097 (p=0,61)). Insgesamt zeigten Rektumzielvolumina (unteres Quartil 5096,5 cm^3; Median 5140 cm^3; oberes Quartil: 5172,5 cm^3; relative Standardabweichung 1,5%) interindividuell sehr geringe und Rektumvolumina (unteres Quartil 1176,5 cm^3; Median 1376 cm^3; oberes Quartil 1546,5 cm^3; relative Standardabweichung 23,1%) größere Unterschiede.

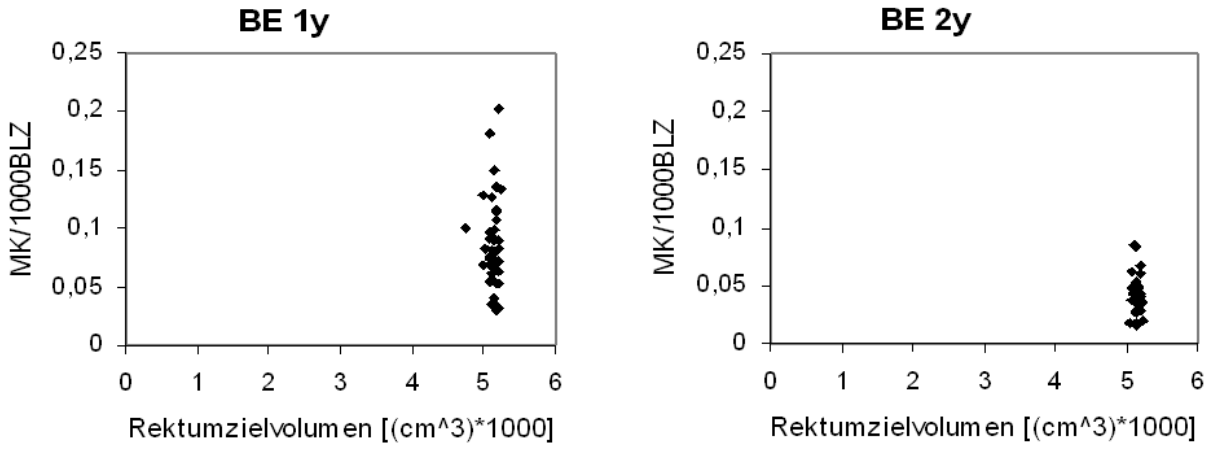

Abbildung 22: MK-Ausbeuten in Abhängigkeit vom Rektumzielvolumen

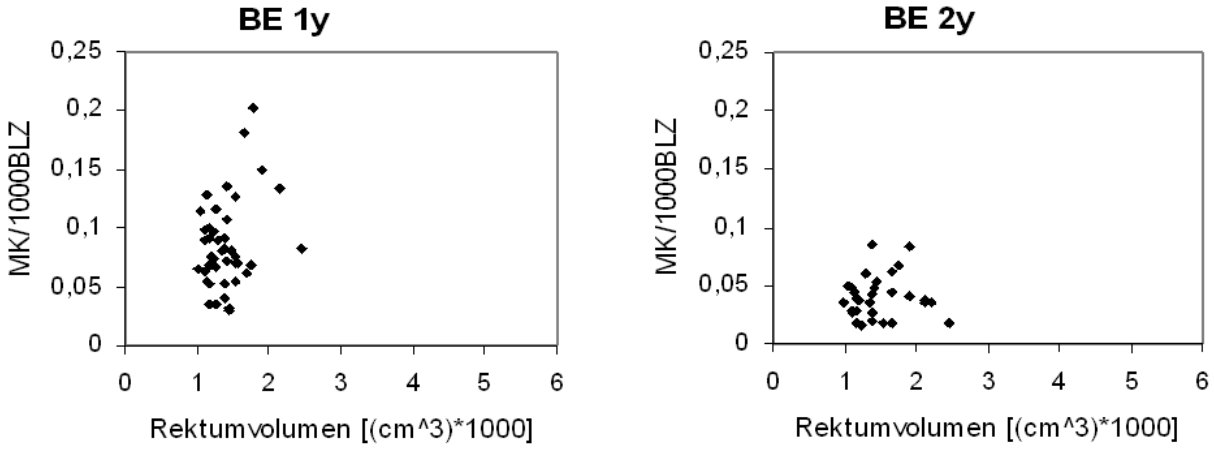

Abbildung 23: MK-Ausbeuten in Abhängigkeit vom bestrahlten Rektumvolumen

3.5 Vergleich mit experimentellen Daten des Kollektivs anderer Untersucher

Im Rahmen der Untersuchungen der KFO 179 wurden bei den Patienten vor, während und am Ende der neoadjuvanten RCT Blutentnahmen in der Abteilung durchgeführt (Helms 2010; Hennies 2010; Wolff et al. 2011b). Die MK-Ausbeuten vor Beginn der RCT (vor RTx) und nach Ende der RCT (Ende RTx) wurden mit jenen bei den NS (BE 1y und BE 2y) verglichen (Abbildung 24). Vor RTx lag der Median der MK pro 1000 BLZ bei 0,012, zur Mitte der RTx bei 0,111 und zum Ende der RTx bei 0,219. Bei BE 1y lag der Median bei 0,076 und bei BE 2y bei 0,038. Die MK-Ausbeuten bei BE 1y und BE 2y lagen signifikant (jeweils $p<0,0001$) über dem Wert vor RTx. Die MK-Ausbeuten bei BE 1y und BE 2y lagen signifikant (jeweils $p<0,0001$) unter dem Wert bei Ende der RTx.

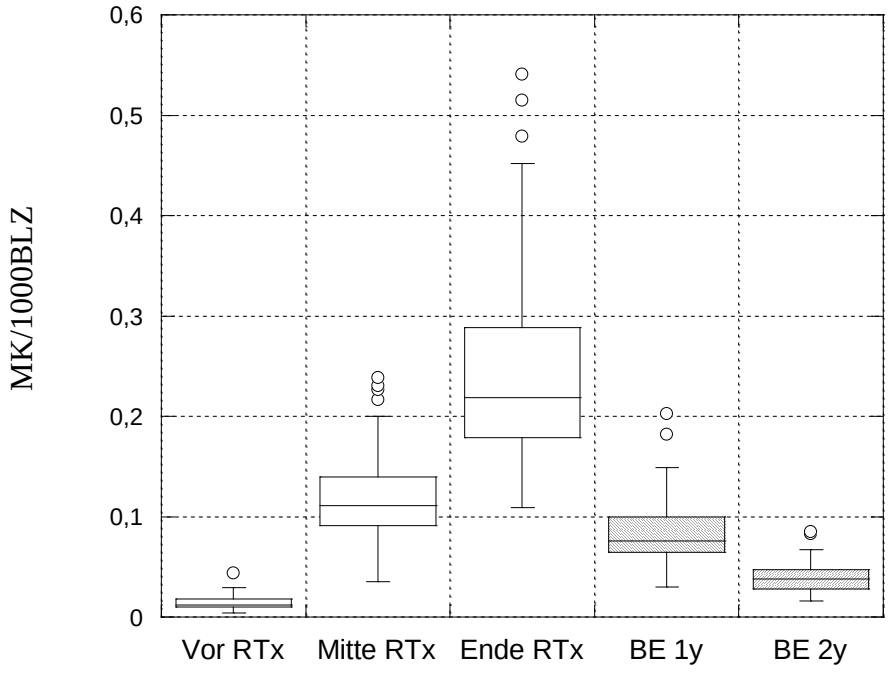

Abbildung 24: MK-Ausbeuten im Verlauf der RTx und bei BE 1y und BE 2y
(Punkte: Ausreißer; oberer und unterer Whisker: 95%- und 5%-Quantile; Box: oberes und unteres Quartil sowie Median)

Der NDI vor RTx wurde mit dem NDI bei BE 1y und BE 2y verglichen (Abbildung 25). Der NDI nahm bei BE 1y (Median 1,44) und BE 2y (Median 1,58) jeweils einen niedrigeren Wert an als vor RTx (Median 1,82). Für den NDI bei BE 1y und BE 2y konnte ein signifikanter (jeweils $p<0,0001$) Abfall verglichen mit dem Wert vor RTx gezeigt werden.

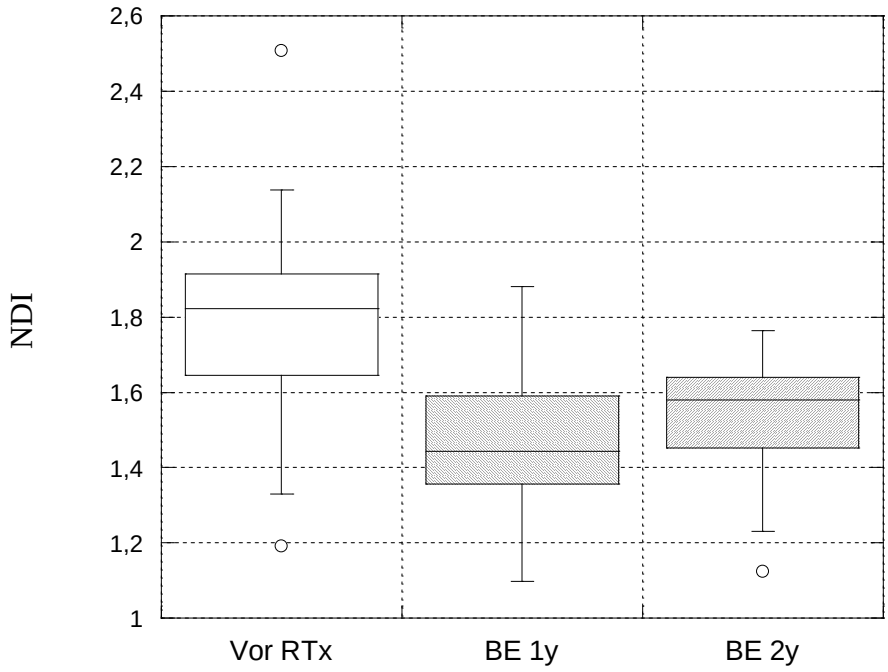

Abbildung 25: NDI vor Beginn der RTx und bei BE 1y und BE 2y
(Punkte: Ausreißer; oberer und unterer Whisker: 95%- und 5%-Quantile; Box: oberes und unteres Quartil sowie Median)

4 Diskussion

4.1 Persistenz von Strahlenschäden im menschlichen Körper

In der vorliegenden Arbeit wurden bei den Probanden einer prospektiven klinischen Phase-III-Studie („Präoperative Radiochemotherapie und adjuvante Chemotherapie mit 5-Fluorouracil plus Oxaliplatin im Vergleich zu einer präoperativen Radiochemotherapie und adjuvanten Chemotherapie mit 5-Fluorouracil beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom im UICC-Stadium II und III“) über einen Zeitraum von 2 Jahren nach Ende der multimodalen Tumortherapie bei lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom die zytogenetischen Schäden (mittels MNT) verfolgt. Die Therapiesequenz bestand aus neoadjuvanter RCT, Operation (nach einem freien Intervall von 4 bis 6 Wochen) und adjuvanter CTx (Einleitung 4 Wochen nach Operation).

Die MK-Ausbeuten zum Zeitpunkt der Nachsorgeuntersuchungen (NS) zeigten eine interindividuelle Variabilität (BE 1y: relative Standardabweichung 44,1%; BE 2y: relative Standardabweichung 44,6%). Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Diskussion der Gründe für Unterschiede innerhalb des Kollektivs. Untersucht wurde, ob Alter und Geschlecht, Zeitpunkt der Blutentnahmen (BE), Bestrahlungsart und Größe der Bestrahlungsvolumina einen Einfluss auf die MK-Ausbeuten hatten. Ein möglicher Einflussfaktor wäre auch eine z. B. durch die genetische Ausstattung der Patienten bedingte unterschiedliche biologische Reaktion der Normalgewebe auf Strahleneinwirkung.

Patienten mit hohen (bzw. niedrigen) MK-Ausbeuten zum Zeitpunkt der 1. NS zeigten auch bei der 2. NS hohe (bzw. niedrige) Ausbeuten. Der intraindividuelle Vergleich der MK-Ausbeuten einzelner Patienten zeigte eine signifikante Korrelation der Werte bei BE 1y und BE 2y (Spearman-Rang-Korrelations-Koeffizient r_s=0,677 ($p<0,01$); Pearson-Koeffizient r=0,633 (p=0,001, r^2=0,401)).

Die Daten anderer Untersucher zeigten eine Zunahme der Strahlenschäden in den BLZ im Verlauf der neoadjuvanten RCT (Helms 2010; Hennies 2010; Wolff et al. 2011b). In dieser Arbeit wurden die Schäden der BLZ 1 und 2 Jahre nach Ende der RCT untersucht. Es konnten in der Zusammenschau die MK-Ausbeuten vor RCT, während RCT, am Ende der RCT und über einen Zeitraum von 2 Jahren nach Ende der RCT im Verlauf betrachtet werden. Die MK-Ausbeuten waren 1 Jahr (BE 1y) und 2 Jahre (BE 2y) nach Ende der RCT signifikant (jeweils $p<0,0001$) über dem Ausgangslevel vor Therapie. Die MK-Ausbeuten lagen bei beiden NS signifikant (jeweils $p<0,0001$) unter dem Level des Endes der RCT. Nach Ende der

genotoxischen Therapie nahmen die untersuchten Schäden in den BLZ von BE 1y zu BE 2y hin ab ($p<0,0001$).

In den letzten Jahrzehnten wurden neben dem MNT verschiedene Techniken angewendet zur Erfassung der Persistenz zytogenetischen Schäden im menschlichen Körper nach Strahlenexposition:

Die Techniken waren Mikronukleustest (MNT, z. B. Fenech et al. 1997), Chromosomenaberrationsanalyse (CAA, z. B. Awa et al. 1978), FISH-(Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)-Analyse (z. B. Chen et al. 2009) und Einzelzellgelelektrophorese (z. B. Gamulin et al. 1995). Vor- und Nachteile von MNT und CAA wurden beschrieben: Die MK-Ausbeute beim MNT kann als guter akuter und vielleicht chronischer „Biodosimeter“ für eine Dosisabschätzung nach *in-vivo*-Strahlenexposition dienen (Lee TK et al. 2002). Der MNT bietet z. B. gegenüber der CAA einige Vorteile: einfachere Durchführbarkeit, Auszählung größerer Zellzahlen in kürzerer Zeit, Verlässlichkeit, Sensitivität und höhere statistische Aussagekraft (Wolff et al. 2011b). Im Gegensatz dazu kann die CAA durch Nachweisbarkeit zytogenetischer Schäden über einen längeren Zeitraum wertvoller als der MNT sein (Liu et al. 2010). Zusätzliche Ansätze wie z. B. die Untersuchung mehrerer Zellarten (z. B. BLZ, ungeteilte mononukleäre Lymphozyten und Erythrozyten) beim MNT könnten helfen, das chronische Ausmaß genetischen Schadens nach genotoxischen Ereignissen besser abzubilden (Fenech et al. 1997).

Arbeiten der letzten Jahrzehnte untersuchten zum einen Patienten, die im Rahmen der Therapie einer Tumorerkrankung einer genotoxischen Behandlung zugeführt wurden (4.1.1) und zum anderen mit Kollektiven nach umweltbedingter Strahlenexposition:

Zytogenetische Schäden nach Umweltereignissen wurden beschrieben für Kinder, die in durch die Reaktorkatastrophe von Tschernobyl radioaktiv kontaminierten Gebieten Weißrusslands lebten (Fenech et al. 1997: Persistenz der zytogenetischen Schäden 5 bis 9 Jahre), und für stark verstrahlte Mitarbeiter der Reaktorcrew (Sevan'kaev et al. 2005: Persistenz 10 bis 13 Jahre). Untersucht wurden zytogenetische Schäden nach den Atombombenabwürfen von Hiroshima und Nagasaki (Awa et al. 1978) und nach akzidenteller Strahlenexposition durch Emission von γ-Strahlung beim Zerfall des Isotops Cobalt-60 (Chen et al. 2009: Persistenz mehrere Jahre; Liu et al. 2010: Persistenz 24 Monate).

4.1.1 Persistenz nach therapeutischer Strahlenexposition

Weitere Arbeiten untersuchten Patienten, die eine Strahlenexposition im Rahmen einer Tumortherapie erfahren hatten:

Untersucht wurden Patienten nach Strahlenexposition im Rahmen der Therapie bei testikulärem Seminom (Gamulin et al. 1995: Persistenz der zytogenetischen Schäden 12 Monate; Schmidberger et al. 2001: Schäden 20 Monate nach Therapie auf prätherapeutischem Level), Prostatakarzinom (Hille et al. 2010: Persistenz 12 Monate), Schilddrüsenkrebs (Gutiérrez et al. 1995: nach 1 Jahr Elimination des Schadens) und verschiedenen Tumorentitäten (Fenech et al. 1990: Persistenz 12 Monate; Lee TK et al. 2002: Persistenz 75 Monate).

Es folgt die Diskussion der klinischen Arbeiten, die am ehesten vergleichbar sind mit dem Ansatz der vorliegenden Arbeit:

Hille et al. untersuchten 2010 mittels CAA und FISH 102 Patienten, die bei Prostatakarzinom (T1-T3, N0-N1 und MO) primär perkutan radiotherapiert wurden. Das mediane Alter des Kollektivs betrug 69 Jahre (Kontrollgruppe: 10 altersentsprechende Männer). Die CAA wurde bei allen Patienten vor RTx durchgeführt. Zusätzlich wurde in einer Subgruppe von 10 Patienten die FISH-Analyse vor Therapie, in der Mitte der Therapie, am Ende der Therapie und 1 Jahr nach Ende der Therapie durchgeführt. Im Rahmen der RTx wurden je nach Stadium Prostata oder Prostata und pelvine Lymphknoten mit 71-72 Gy (Dosis der Prostata) und 45 Gy (Dosis des Beckens) mit 5 Fraktionen pro Woche bestrahlt. Die Ausbeute an DNA-Schäden erhöhte sich nach Beginn der Therapie und war nach einem Jahr vergleichbar mit jener direkt am Ende der RTx (Hille et al. 2010).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Persistenz der zytogenetischen Schäden im 1. und 2. Jahr nach Ende der Therapie wird durch Hille et al. für den Wert nach 1 Jahr unterstützt. Hille et al. fanden eine mit Werten vom Ende der RTx vergleichbare Ausbeute an Schäden nach 1 Jahr, die einem Absinken beim Messzeitpunkt nach 1 Jahr in der vorliegenden Arbeit gegenübersteht. Gemeinsamkeiten beider Untersuchungen sind das vergleichbare Alter des Kollektivs (medianes Alter 69 Jahre vs. Mittelwert 62,5 Jahre) und die Applikation der RTx mit 5 Fraktionen pro Woche im Becken. Wichtige Unterschiede sind die applizierte Dosis (71-72 Gy im Bereich Prostata und 45 Gy im Becken vs. 50,4 Gy im Zielvolumen), die zusätzliche Behandlung (keine systemische CTx vs. 5-FU bzw. 5-FU und Oxaliplatin) und die Methodik (CAA vs. MNT).

Andere Arbeiten zeigten eine Elimination des genetischen Schadens im zeitlichen Verlauf:

Gutiérrez prüfte 1995 das genotoxische Risiko des therapeutischen Einsatzes von Iod-131. Er ermittelte die MK-Ausbeute in PBL bei 22 an Schilddrüsenkrebs erkrankten Frauen, die Iod-131 oral und adjuvant nach Thyreoidektomie erhalten hatten. Die MK wurden in den jährlichen Nachsorgeuntersuchungen (1-5 Jahre nach Ende der Therapie) bestimmt. Den Probanden stellte er eine Kontrollgruppe von 19 nicht-exponierten Frauen gegenüber. Gutiérrez fand keinen signifikanten Unterschied zwischen MK-Ausbeuten in Studien- und Kontrollgruppe. Daraus folgerte er, dass jeder mögliche genetische Schaden durch Iod-131 nach 1 Jahr eliminiert würde (Gutiérrez et al. 1995).

In der Untersuchung durch Gutiérrez wurde systemisch Iod-131 appliziert. Die biologische Wirkung ist somit in der gesamten Blutzirkulation und im gesamten roten Knochenmark des Organismus zu erwarten. Zusätzlich wird davon ausgegangen, dass 90% der Strahleneffekte bei Iod-131 auf der emittierten β-Strahlung beruhen (Gutiérrez et al. 1995), nicht auf der γ-Komponente. Die biologische Qualität ist somit eine andere als bei RTx des Rektumkarzinoms. Hier kann man davon ausgehen, dass eine MK-Induktion in erster Linie lokal im bestrahlten Volumen des Beckens durch Wirkung von γ-Strahlung auf Knochenmark oder zirkulierende Blutzellen erfolgt.

Schmidberger et al. untersuchten 2001 mittels FISH die chromosomalen Translokationen (Chromosomen 4, 6 und 7) in PBL von 30 Patienten eines altersmäßig relativ homogenen Kollektivs (4. Lebensdekade) mit testikulärem Seminom. Patienten mit Seminom im Stadium I erhielten eine RTx der paraaortalen Lymphknoten mit 26 Gy, bei der das Bestrahlungsfeld 12% des aktiven Knochenmarks der Patienten involvierte. Patienten im Stadium II erhielten eine RTx mit insgesamt 30-36 Gy von paraaortalen Lymphknoten und ipsilateralen iliakalen Lymphknoten, die 18% des aktiven Knochenmarks involvierte. Die RTx erfolgte mit ventrodorsalen Gegenfeldern. Blutproben wurden bei 13 Patienten vor RTx und an mehreren Zeitpunkten nach RTx und bei 17 weiteren Patienten nur nach RTx akquiriert. Die Kontrollgruppe wurde durch 13 gesunde männliche nach dem Alter vergleichbare Probanden gebildet. Fast alle Patienten zeigten dabei verglichen mit den Kontrollen schon vor RTx eine erhöhte Rate spontaner genomischer Translokationen. Nach der RTx erhöhte sich die Mutationsrate bei den Probanden um das 2- bis 8-fache und sank innerhalb von 20 Monaten nach Ende der RTx wieder auf prätherapeutische Level (Schmidberger et al. 2001).

Das durch Schmidberger et al. erfasste Absinken der Level an DNA-Schäden auf prätherapeutische Level in 20 Monaten steht der in dieser Arbeit gemessenen Persistenz der Schäden über 2 Jahre entgegen. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf Unterschiede

in Gesamtdosis (26 Gy bzw. 30-36 Gy vs. 50,4 Gy), Patientenalter (4. Lebensdekade vs. im Mittel 62,5 Jahre), Zielvolumen (paraaortale Lymphknoten bzw. paraaortale Lymphknoten mit ipsilateralen iliakalen Lymphknoten vs. Rektum), Bestrahlungstechnik (ventrodorsales Stehfeld vs. 3D-konformale Bestrahlung bzw. IMRT bzw. VMAT bzw. VMAT und 3DCRT) und CTx (keine vs. 5-FU bzw. 5-FU mit Oxaliplatin zusätzlich) zurückzuführen sein.

4.1.2 NDI und NDCI: Mitotische Aktivität der PBL

Der NDI (*Nuclear Division Index*) lag zum Zeitpunkt der NS (BE 1y: Median 1,44 und BE 2y: Median 1,58) signifikant niedriger als vor Beginn (Median 1,82) der RTx (jeweils $p<0,0001$; Werte vor RTx: Helms 2010; Hennies 2010; Wolff et al. 2011b). Gleichzeitig zeigte sich ein Anstieg des NDI von 1. zu 2. NS (keine statistische Signifikanz; $p=0,05$). Der NDCI (*Nuclear Division Cytotoxicity Index*) stieg im Verlauf von 1. (Median 1,30) zu 2. (Median 1,38) NS (statistische Signifikanz; $p=0,03$; Werte vor RTx nicht erfasst durch andere Untersucher). Der NDCI nahm signifikant (jeweils $p<0,0001$) niedrigere Werte als der NDI bei BE 1y und BE 2y an.

Arbeiten der letzten Jahrzehnte befassten sich mit dem Verhalten des NDI bei *in-vitro*-Experimenten:

Fenech beschrieb 2000 den NDI als nützlichen Parameter für den Vergleich der mitotischen Antwort von Lymphozyten mit zytostatischen Effekten von Agenzien. Den NDCI (Miterfassung von nekrotischen und apoptotischen Zellen) bewertete er als genaueren Parameter zur Erfassung des Status der Zellteilung, da bei hohen Dosen der Agenzien Apoptosen und Nekrosen häufiger auftraten. Daher erfolgte eine Überschätzung des NDI (Fenech 2000). Eastmond und Tucker beschrieben 1989 nach Blutentnahmen bei gesunden männlichen freiwilligen Probanden für PBL eine dosisabhängige Abnahme des NDI bei *in-vitro*-Bestrahlung (0 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy). Verglichen mit anderen genotoxischen Agenzien (z. B. Colchizin, Vinchristin) war die Abnahme des Index bei Bestrahlung gering (Eastmond & Tucker 1989).

Das Verhalten des NDI im Rahmen einer *in-vivo*-Strahlenexposition wurde ebenfalls beschrieben:

Jianlin et al. untersuchten 2004 24 Patienten mit RTx bei verschiedenen Tumorentitäten. Blutentnahmen erfolgten vor RTx und nach Applikation von 10, 30 und 50 Gy. Der mittlere

NDI nahm mit zunehmender RTx-Dosis ab (Werte im Verlauf der Blutentnahmen: 1,81; 1,72; 1,60; 1,54), was auf eine reduzierte Teilung der Lymphozyten hindeutete (Jianlin et al. 2004). Mit den Ergebnissen im Rahmen der NS dieser Arbeit unmittelbar vergleichbare Untersuchungen liegen nicht vor (Erfassung des NDI bzw. NDCI Jahre nach einer Tumortherapie, nicht während Tumortherapie). Vor Beginn der RCT lag der NDI auf einem mit Jianlin's Ergebnissen vergleichbaren Level (1,82 und 1,81). Mutmaßlich (in dieser Arbeit nicht untersucht) erfolgte durch die RCT, wie bei Jianlin et al. 2004 und bei *in-vitro*-Untersuchungen beschrieben, ein Abfall des NDI zum Ende der Therapie hin. Der Wert des NDI war vor RCT höher als bei der 1. NS und stieg dann zur 2. NS (jedoch Wert noch niedriger als vor RCT) hin an. Es kann vermutet werden, dass die Teilungsfähigkeit der Lymphozyten durch die RCT beeinflusst wurde (Abfall des NDI) und sich im Laufe der Zeit wieder erholte (Anstieg des NDI). Eine Möglichkeit der Interpretation wäre, dass der Effekt bei beiden NS zu beobachten war, jedoch durch Erholungsprozesse bei der 2. NS weniger ausgeprägt war. Der Anstieg des NDI von 1. NS zu 2. NS war nicht statistisch signifikant. Eine Erklärung könnten die niedrige Fallzahl (31 Proben) und ein langsames Ablaufen des Erholungsprozesses mit nur im längeren Verlauf beobachtbaren Effekten sein.
Der NDCI erfasste den Status der Zellkultur genauer (Fenech 2005) als der NDI. Der statistisch signifikante Unterschied zwischen NDI und NDCI bei BE 1y und BE 2y zeigte, dass ein nicht zu vernachlässigender Anteil an Apoptosen und Nekrosen auch bis 2 Jahre nach Ende der genotoxischen Therapie zu beobachten ist. Dies könnte ein Hinweis auf langfristige Auswirkung des genotoxischen Einflusses der RTx auf die Population der Lymphozyten sein.

4.2 Zytogenetische Schäden und klinische Toxizität nach Radio-(chemo-)therapie

Es wurde geprüft, ob bei Patienten mit einem höheren Grad der Spättoxizität zum Zeitpunkt der NS höhere MK-Ausbeuten vorlagen als bei Patienten mit Toxizität geringeren Grades.
Es bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang für die Hauttoxizität ($p=0,29$ für BE 1y und $p=0,50$ für BE 2y). Die Analyse zeigte keinen signifikanten Zusammenhang für die Rektumtoxizität ($p=0,62$ für BE 1y und $p=0,69$ für BE 2y). Bei der Gesamttoxizität bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=0,56$ für BE 1y und $p=0,83$ für BE 2y).
Die Analyse zeigte für die Blasentoxizität einen statistisch signifikanten Zusammenhang bei BE 1y ($p=0,025$), jedoch keinen bei BE 2y ($p=0,45$). Es konnte für BE 1y ein signifikanter statistischer Unterschied ($p<0,01$) zwischen MK-Ausbeuten bei Patienten ohne Spättoxizität

(Grad 0) und Patienten mit Spättoxizität (≥Grad 1) gezeigt werden. Hinsichtlich dieser Ergebnisse sollte dieses Organ weiter beobachtet werden.

Der Ansatz dieser Arbeit stand im Gegensatz zu vergleichbaren Fragestellungen anderer Untersucher, so dass in der Literatur nur wenige direkt vergleichbare Arbeiten existierten. Persistierende DNA-Schäden wurden in dieser Arbeit direkt zum Zeitpunkt der Ermittlung der Spättoxizität (Blutentnahmen im Rahmen der NS) erfasst. Die Hypothese war, dass ein persistierender DNA-Schaden direkt auf eine höhere Strahlensensitivität der Patienten hinweist, der sich an Lymphozyten (im MNT) und auch an anderen Geweben (Auftreten von Spättoxizität) zeigte. Risikoorgane (z. B. Blase und Haut) wurden ebenso wie Blut und Knochenmark als biologische Systeme bei gleichzeitiger Erfassung der DNA-Schäden und der Spättoxizität natürlichen Einflüssen bis zum Zeitpunkt der Untersuchung überlassen. Dies war z. B. interessant, da es möglich wäre, dass DNA-Reparaturmechanismen in den Risikoorganen und im System aus Blut und Knochenmark verschiedene zeitabhängige Verläufe oder unterschiedliche Gewebearten verschiedenes Proliferationsverhalten zeigten. Der Vorteil des Ansatzes dieser Arbeit könnte also die Ermöglichung einer Abbildung dieser Effekte sein. Andere Arbeiten verfolgten den Ansatz der Evaluation der zytogenetischen Reaktion auf *in-vitro*-Bestrahlung im MNT durch Blutentnahmen vor Therapiebeginn. In den folgenden Arbeiten konnten zum Teil Zusammenhänge des Ausmaßes der zellulären Reaktion mit auftretender Akut- und Spättoxizität nach Tumortherapie gezeigt werden:

Lee untersuchte 2003 die Korrelation der Radiosensitivität von Lymphozyten mit Morbidität nach RTx des Beckens (MNT bei 38 Patienten mit Prostatakrebs vor Beginn der RTx). Die PBL der Patienten wurden mit 1-4 Gy *in vitro* bestrahlt. Nebenwirkungen wurden nach im Mittel 32,8 Monaten (während RTx wöchentlich, die 2 folgenden Jahre alle 3 Monaten, dann alle 6 Monate) erfasst. Lee fand einen signifikanten Unterschied bezüglich der MK-Ausbeute zwischen Patienten mit Grad-1- oder niedriggradigeren Nebenwirkungen und Patienten mit Grad-2- oder höhergradigeren Nebenwirkungen. Lee beschrieb die vor RTx bestimmbare dosisabhängige MK-Ausbeute nach *in-vitro*-Bestrahlung als signifikanten prädiktiven Faktor für die Entwicklung gastrointestinaler oder Harn- und Geschlechtsorgane betreffender Nebenwirkungen nach RTx des Beckens beim Prostatakarzinom (Lee TK et al. 2003).

Widel untersuchte 2003 mittels MNT das Blut von 55 Patienten mit fortgeschrittenem Cervixkarzinom (Tele- und Brachytherapie) vor Beginn der RTx. Akut- und Spätnebenwirkungen wurden erfasst und korreliert mit den MK-Ausbeuten nach Bestrahlung mit 4 Gy *in vitro*. Widel fand eine große interindividuelle Variabilität hinsichtlich der MK-Ausbeuten. Die mittlere MK-Ausbeute nach Bestrahlung mit 4 Gy war signifikant höher bei

Patienten mit Akut- und/oder Spätnebenwirkungen als bei Patienten ohne Nebenwirkungen. Eine signifikante Korrelation zwischen der MK-Ausbeute nach Bestrahlung mit 4 Gy und der Schwere der Akut- und Spätreaktionen wurde beschrieben. Widel bewertete den MNT in der angewandten Form wegen der großen Überlappung der Ausbeuten bei Patienten mit hoch- und niedriggradigen Spätnebenwirkungen als nicht zu empfehlen für routinierte klinische Anwendungen (Widel et al. 2003).

Rached konnte 1998 keinen Zusammenhang zwischen Auftreten von klinischer Toxizität und zytogenetischen Schäden im MNT zeigen: Er verglich die MK-Ausbeute nach *in-vitro*-Bestrahlung mit 4 Gy bei 15 Patienten mit Therapieabbruch einer RTx wegen schwerer Akutreaktionen, 15 Patienten mit RTx ohne Akutreaktionen und 15 Gesunden (Kontrollgruppe). Die Blutentnahmen erfolgten bei den Patienten ohne Reaktionen vor und am Ende der RTx und bei den Patienten mit Nebenwirkungen bei Abbruch der Therapie. Die durchschnittlich durch die Bestrahlung induzierte MK-Anzahl war signifikant höher bei der Studiengruppe als bei der Kontrollgruppe. Es gab keinen Zusammenhang zwischen MK-Ausbeuten und dem Auftreten von Akutnebenwirkungen (Rached et al. 1998).

4.3 Einflussvariablen: Biologische Faktoren und Bestrahlungsplanung

4.3.1 Alter und Geschlecht

Das mittlere Patientenalter bei Therapiebeginn betrug 62,5 Jahre, das Altersmaximum 82 Jahre und das Altersminimum 41 Jahre. Das Alter der Patienten hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die MK-Ausbeuten (Korrelationsanalyse: r_s=0,24 und p=0,12 für BE 1y, r_s=0,28 und p=0,12 für BE 2y).

Es konnte gezeigt werden, dass das Geschlecht (28 Männer, 20 Frauen) bei BE 1y einen statistisch signifikanten (p=0,03; MK-Ausbeute bei Frauen 25% höher) Einfluss auf das Level der persistierenden zytogenetischen Schäden nach der RCT hatte, jedoch nicht bei BE 2y (p=0,19; MK-Ausbeute bei Frauen 28% höher).

Mehrere Untersuchungen konnten seit 1985 einen Effekt von Alter oder Geschlecht auf die Ergebnisse des MNT zeigen:

Bonassi untersuchte 1995 den Einfluss des Geschlechts auf zytogenetische Endpunkte. Er führte eine Metaanalyse durch (>2000 Probanden), die Ergebnisse der vorangegangenen Jahrzehnte (1969-1993) bezogen auf Schwesterchromatidaustausche, Chromosomenaberrationen und MK berücksichtigte. Zur Untersuchung der

Geschlechtsunterschiede wurden Confounder wie Alter, Rauchen und Exposition am Arbeitsplatz korrigiert. Bonassi fand keine signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen für Schwesterchromatidaustausche und Chromosomenaberrationen. Für MK fand er eine um 29% höhere Rate bei Frauen. Der Unterschied zwischen den Geschlechtern sei im Alter unter 44 Jahren sehr limitiert und trete in den folgenden Dekaden stärker auf, so dass die Unterschiede in Studien mit jüngeren Populationen deswegen nicht messbar sein könnten (Bonassi et al. 1995).

Surrallés und Natarajan untersuchten 1997 die Variabilität der Ergebnisse von 30 Laboren in Europa bezogen auf den MNT. Sie beschrieben Alter und Geschlecht der Probanden als wichtigsten Störfaktor für das Auftreten von MK. Die Anzahl der MK pro 1000 Zellen stieg im Durchschnitt um 0,17 pro Lebensjahr (Surrallés & Natarajan 1997).

Fenech und Morley untersuchten 1985 und 1986 den Effekt des Alterns auf die Ergebnisse des MNT. Sie untersuchten 1985 103 gesunde Probanden und fanden eine etwa 4-fache Erhöhung der MK-Ausbeute bei 80jährigen in Relation zu Neugeborenen. Sie bestrahlten die Lymphozyten der Probanden *in vitro* und behandelten sie mit dem Zytostatikum Mitomycin C. Die Bildung von MK war nach der Behandlung bei älteren Individuen im Gegensatz zu jüngeren vermindert (Fenech & Morley 1985b). Fenech und Morley beschrieben 1986 eine Zunahme der spontanen Rate an MK in der Altersgruppe von 20 bis 85 Jahren (42 Individuen) um 4,3% pro Jahr (Fenech & Morley 1986).

Awa konnte 1978 keinen Effekt des Alters auf Ergebnisse der Chromosomenaberrationsanalyse zeigen. Er untersuchte Überlebende der Atombombenabwürfe auf Hiroshima und Nagasaki, für die es Abschätzungen der erhaltenen Strahlendosis gab. Awa bildete 2 Altersgruppen innerhalb des Kollektivs und fand keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Probanden unter 30 Jahren und Probanden über 30 Jahren, weder in der Kontroll- noch in der Studiengruppe (Awa et al. 1978).

In dieser Arbeit (MK-Ausbeute bei Frauen 25% (BE 1y) bzw. 28% (BE 2y) höher als bei Männern) wurden mit Bonassis Untersuchungen (29% höhere MK-Ausbeute bei Frauen) vergleichbare Ergebnisse für die MK-Ausbeuten gefunden. Das mittlere Alter des Kollektivs betrug 62,5 Jahre, so dass es altersmäßig nach Bonassi geeignet (Effekt des Alterns unter 44 Jahren sehr limitiert) war, um die geschlechtsbezogenen Unterschiede abzubilden.

Der in dieser Arbeit beschriebene geschlechtsabhängige Unterschied war nur bei BE 1y statistisch signifikant, nicht bei BE 2y. Eine Erklärung könnte die auch im Vergleich zu den beschriebenen Arbeiten (2131 Patienten mit MNT bei Bonassi; Ergebnisse von 30 Laboren

bei Surrallés und Natarajan) niedrige Fallzahl liefern, die bei BE 2y (31 Individuen) nicht und bei BE 1y (43 Individuen) gerade ausreicht zur Diskrimination des Unterschiedes.
Unterschiedliche Ergebnisse könnten durch verschiedene Altersstrukturen der Kollektive (41 bis 82 Jahre in der vorliegenden Arbeit vs. Neugeborene und 80jährige bzw. 20-85jährige bei Fenech & Morley vs. Vergleich von Individuen über 30 Jahren und unter 30 Jahren bei Awa) und Art oder Anwesenheit von genotoxischem Einfluss bedingt sein. Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten erfuhren sämtlich ein vergleichbares genotoxisches Ereignis *in vivo* in Form einer multimodalen Tumortherapie. Awa untersuchte ein Kollektiv nach *in-vivo*-Strahlenexposition durch Atombombenabwürfe und konnte ebenfalls keinen Effekt des Alters zeigen. Fenech und Morley führten die BLZ 1985 *in vitro* einer genotoxischen Behandlung zu (Mitomycin C) und untersuchten 1986 die MK-Raten bei Gesunden. In beiden Fällen konnte ein Effekt des Alters auf die Ausbeuten im MNT gezeigt werden.
Eine Zusammenschau der Ergebnisse all dieser Untersuchungen (Nachteil: studienübergreifender Vergleich) könnte das Fehlen des altersabhängigen Unterschieds der MK-Ausbeuten im Kollektiv der vorliegenden Arbeit erklären: Ältere Patienten hätten spontan eine höhere Rate zytogenetischer Schäden (Fenech & Morley 1986, Surrallés & Natarajan 1997). Gleichzeitig reagierten die BLZ im Alter mit einer weniger ausgeprägten MK-Bildung nach genotoxischer Behandlung (*in-vitro*-Exposition mit Mitomycin C, Fenech & Morley 1985b). Die beiden Effekte könnten gemeinsam dazu geführt haben, dass altersabhängige Unterschiede in dieser Arbeit nicht nachzuweisen waren.

4.3.2 Bestrahlungsart und Bestrahlungsvolumina

Die Prüfung eines Zusammenhangs zwischen Bestrahlungsart und MK-Ausbeuten zeigte für BE 1y keinen signifikanten Unterschied (p=0,11) zwischen Patienten, die 3D-konformal bestrahlt wurden (37 Patienten), und Patienten, bei denen eine andere Bestrahlungsart (IMRT, VMAT, VMAT und 3DCRT) angewandt wurde (6 Patienten). Für BE 2y konnte der Zusammenhang nicht geprüft werden, da alle Patienten 3D-konformal bestrahlt wurden.
Die Korrelationsanalyse wurde durchgeführt für die MK-Ausbeute in Abhängigkeit vom Rektumzielvolumen bzw. vom bestrahlten Rektumvolumen. Die Analyse zeigte keine statistische Abhängigkeit der MK-Ausbeuten von der Größe der Rektumzielvolumina bzw. der bestrahltem Rektumvolumina (Rektumzielvolumen: BE 1y: r_s=0,07 und p=0,64; BE 2y:

r_s=0,09 und p=0,63; bestrahltes Rektumvolumen: BE 1y: r_s=0,16 und p=0,31; BE 2y: r_s=0,097 und p=0,61).

Die IMRT-Technik erlaubt die Applikation von Dosis in einem Tumor bei Vermeidung oder Limitierung von Dosis für kritische Strukturen. Die Anwendungszeit des IMRT kann länger sein als die von 3DCRT, je nach Planungsparametern. VMAT ist eine spezifische Form der IMRT mit um den Patienten rotierender Gantry und sich dabei bewegenden Multilamellenkollimatoren (McGarry et al. 2010).

Arbea et al. verglichen 2010 IMRT und 3DCRT bei lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom in Bezug auf Dosimetrie und klinische Inhalte. IMRT-Pläne verbesserten die Konformität mit dem Zielvolumen und verringerten die Bestrahlung der Risikoorgane auf Kosten von erhöhter Heterogenität des Bestrahlungsziels. IMRT-Pläne erhöhten das mit 5 Gy oder weniger bestrahlte Körpervolumen und verringerten das mit 20 Gy oder mehr bestrahlte Volumen (Arbea et al. 2010).

Diese Unterschiede verschiedener Bestrahlungsarten z. B. hinsichtlich der Dosisverteilung legten eine Prüfung des Zusammenhangs mit der biologischen Wirksamkeit (MK-Induktion) nahe. Hartel et al. konnten 2010 eine Beeinflussung der Induktion zytogenetischer Schäden durch unterschiedliche Bestrahlungsarten und Größen von Bestrahlungsvolumina zeigen:

Die Untersuchung erfasste chromosomale Aberrationen (Giemsa-Färbung und FISH-Analyse) in PBL von Prostatakarzinom-Patienten (zum Teil mit Lymphknotenbestrahlung). 20 Patienten erhielten entweder einen Kohlenstoffionen-Boost mit IMRT im Anschluss oder alleinige IMRT. Die zytogenetischen Schäden wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der RTx untersucht. Es wurden *in-vitro*-Dosiseffektkurven (Blutentnahmen vor RTx) für die Induktion zytogenetischer Schäden durch Röntgenstrahlen und Kohlenstoffionen verschiedener Energien erstellt. Die Ausbeute an Aberrationen *in vivo* stieg während der RTx, wobei die Rate bei vergleichbaren Zielvolumina bei Kohlenstoffionen-Therapie mit IMRT niedriger war als bei alleiniger IMRT. Bei größeren Zielvolumina traten mehr Aberrationen auf. Hartel folgerte, dass die reduzierte integrale Dosis am Normalgewebe zu einer geringeren Anzahl an Aberrationen bei Nutzung eines Kohlenstoffionen-Boosts im Gegensatz zu alleiniger IMRT führte (Hartel et al. 2010)

In dieser Arbeit (3DCRT vs. IMRT und VMAT und VMAT mit 3DCRT) wurden andere Techniken gegenübergestellt als bei Hartel (IMRT vs. IMRT mit Kohlenstoffionen-Boost) und es konnte kein Einfluss der Bestrahlungsart auf die MK-Ausbeuten gezeigt werden. Stärkere Ausmaße der Reduzierung der Normalgewebs-Dosis bei Hartel könnten die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Der Vergleich der integralen Dosen würde weitere

Untersuchungen erfordern. Hartel fand im Gegensatz zu dieser Arbeit eine größere Ausbeute an Aberrationen für größere Zielvolumina. Z. B. größere Unterschiede der Zielvolumina (interindividuell homogene Zielvolumina in dieser Arbeit: relative Standardabweichung 1,5% vs. Patienten ohne (Zielvolumina 73-174 cm^3) und mit (Zielvolumina 722-1247 cm^3) Lymphknotenbestrahlung) innerhalb des Kollektivs bei Hartel oder unterschiedliche biologische Wirksamkeit der Bestrahlungsarten könnten diesen Unterschied erklären.
Weitere Untersuchungen konnten neben Hartel et al. eine Abhängigkeit der Ausbeute zytogenetischer Schäden von der Größe der Bestrahlungsvolumina zeigen:
Durante et al. zeigten 1999 bei 30 Patienten (RTx bei verschiedenen Tumorentitäten) eine Abhängigkeit der Ausbeuten an Chromosomenaberrationen (Vergleich des induzierten Schadens mit prätherapeutischen *in-vitro*-Kurven) von der Feldgröße (Durante et al. 1999).
Lee et al. zeigten 2004 bei 20 Patienten (Kohlenstoffionen-Therapie bei Bronchialkarzinom) mittels CAA eine Abhängigkeit der Ausbeute zytogenetischer Schäden vom Zielvolumen (Lee R et al. 2004).

4.3.2.1 Biologische Kompartimente und MK: Induktion und zeitlicher Verlauf

Es wurde geprüft, ob der Zeitpunkt der BE in Relation zur vorangegangenen Tumortherapie die Ausbeute zytogenetischer Schäden beeinflusste. Der zeitliche Abstand zwischen Operation und BE (BE 1y: Spearman'scher Rang-Korrelations-Koeffizient r_s=0,16 (p=0,30); BE 2y: r_s=0,03 (p=0,88)) oder zwischen Ende der CTx und BE (BE 1y: r_s=0,005 (p=0,98); BE 2y: r_s=0,19 (p=0,31)) korrelierte nicht mit den MK-Ausbeuten.
Mehrere Arbeiten diskutierten pathophysiologische Hintergründe der Entstehung zytogenetischer Schäden an PBL durch Betrachtung der einzelnen biologischen Kompartimente im Bestrahlungsvolumen. Biologische Unterschiede zwischen Patienten und eine Vermischung der im Folgenden beschriebenen Effekte könnten zeigen, warum eine isolierte Betrachtung z. B. der Größe der Bestrahlungsvolumina oder der Zeitabstände zur Tumortherapie nicht die interindividuellen Unterschiede der MK-Ausbeuten in dieser Arbeit erklärte.
Hinsichtlich der direkten Strahleneffekte an im Blut des Bestrahlungsvolumens zirkulierenden PBL ist deren Lebensdauer relevant:
Bogen untersuchte 1993 die Lebensspanne humaner peripherer T-Lymphozyten durch Ableitung von zytogenetischen und zytotoxischen Strahleneffekten. Langlebige „Memory-T-Zellen" waren nicht homogen bezogen auf die Lebensspanne, T1-Zellen lebten

im Mittel 1,1 Jahre und T2-Zellen im Mittel 6,3 Jahre. T1-Zellen bildeten etwa 60% der zirkulierenden T-Lymphozyten und etwa 9% von ihnen konvertierten pro Jahr in langlebige T2-Zellen (Bogen 1993).

Es wurde eine Assoziation der Strahlendosis des blutbildenden Knochenmarks mit Schäden an PBL diskutiert:

Heinze et al. fanden bei PBL (Giemsa-Bänderung, Karyotypisierung) 5 Jahre nach einem Ereignis (Ganzkörperbestrahlung und Knochenmarktransplantation) konstante Aberrationen. Ein großer Teil stammte von strahlengeschädigten und klonal expandierenden Stammzellen ab (Heinze et al. 1995). Catena versuchte 2000 (unter anderem mittels MNT), die Dosis, die Patienten nach Iod-131-Therapie erhalten hatten, abzuschätzen. Er beschrieb eine Korrelation der Knochenmarkdosis mit dem an PBL gemessenen Schaden (Catena et al. 2000). Schmidberger et al. diskutierten die Strahlenwirkung auf PBL und Knochenmarkstammzellen: Bei Bestrahlung eines kleinen Knochenmarkvolumens mit hohen Dosen überlebten wenige Stammzellen mit stabilen Aberrationen. Direkt nach RTx messbare Aberrationen wären auf Schäden an PBL zurückzuführen und verschwänden mit der Zeit durch die natürliche Halbwertszeit der PBL. Anschließend brächten Stammzellen wenig alterierte PBL hervor und Strahlenschäden wären nicht messbar. Bei Bestrahlung großer Knochenmarkvolumina überlebte eine große Anzahl an Stammzellen mit stabilen Aberrationen und eine Population von PBL zeigte persistierende zytogenetische Schäden (Schmidberger et al. 2001).

Es wurde der Effekt der Strahlenwirkung auf Lymphknoten diskutiert:

D'Alesio et al. untersuchten 2003 22 Mammakarzinom-Patienten mit brusterhaltender Therapie und adjuvanter RTx (CAA; Blutentnahmen vor, während und am Ende der RTx). Feldgröße, vorangegangene CTx und Therapiemorbidität erklärten nicht die große interindividuelle Variabilität der zytogenetischen Schäden. Die Ausbeute an Chromosomenaberrationen am Ende der Therapie war signifikant höher in der Gruppe ohne Lymphknotenentnahme im Rahmen der Operation als bei Patienten mit ≥10 entfernten Lymphknoten. D'Alesio schloss, dass die Anzahl der residuellen Lymphknoten im Bestrahlungsgebiet eine wichtige Rolle spielte. Lymphozyten migrierten vom Blut in lymphatische Gewebe und zurück ins Blut. So führte die chirurgische Entfernung von Lymphknoten aus dem Bestrahlungsgebiet zu einer geringeren Anzahl von Zielzellen und somit zu niedrigeren Ausbeuten in der CAA (D'Alesio et al 2003).

Im Weiteren erfolgt ein Transfer der genannten Aspekte auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit:

Vor RTx waren die MK-Ausbeuten niedriger und am Ende der RTx höher als bei den NS. Die MK-Ausbeuten sanken von 1. NS zu 2. NS. Der Anstieg im Verlauf der Therapie könnte dabei auf direkte Schäden an PBL (im MNT in erster Linie T-Lymphozyten) und Schäden an Knochenmarkstammzellen zurückgeführt werden. In den 2 Jahren nach Ende der RTx könnte eine sukzessive Erholung von PBL und Stammzellen erfolgen (Absinken der MK-Ausbeuten). Ebenso könnten Schäden an Stammzellen konstant bleiben (entsprechend Heinzes Untersuchungen) und der Effekt des Absinkens der MK-Ausbeuten beruhte nur auf der Reduktion der Schäden an PBL durch T-Lymphozyten-Umsatz im peripheren Blut (mittlere Lebensspanne von T1-Zellen 1,1 Jahre; entsprechend 60% der zirkulierenden T-Lymphozyten; Bogen 1993).

Catena zeigte, dass das Ausmaß der zytogenetischen Schäden mit der Knochenmarkdosis korrelierte. Die in dieser Arbeit untersuchten Bestrahlungsvolumina spiegelten nicht die Knochenmarkdosis wider. Bei der RTx des Beckens könnten interindividuelle anatomische Unterschiede (z. B. Winkel der Beckenkippung) oder Unterschiede der regionalen Verteilung des blutbildenden Knochenmarks (bei Erwachsenen in verschiedenen Untersuchungen z. B. Anteil des aktiven Knochenmarks eines Individuums im Becken zwischen 17,1% und 39,0%; Cristy 1981) eine Rolle spielen. Für die Frage nach einem Zusammenhang mit den MK-Ausbeuten wären also weitere Untersuchungen bezüglich der Dosisbelastung des aktiven Knochenmarks erforderlich.

D'Alesio fand eine Abhängigkeit der Ausbeute zytogenetischer Schäden bei Mammakarzinom-Patienten von der nur bei einem Teil der Patienten durchgeführten operativen Lymphknotenentnahme im Vorfeld der adjuvanten RTx. Beim Kollektiv dieser Arbeit waren die Feldgrenzen streng anatomisch definiert bei neoadjuvanter RCT (keine Lymphknotenentnahme vor RCT). Unterschiedliche MK-Ausbeuten könnten durch physiologische Variation des Lymphknotenbesatzes im Becken (Jensen et al. 2010: Hinweise auf physiologische Variation des Lymphknotenbesatzes im Becken bei Patienten mit Blasenkarzinom) und somit physiologische Unterschiede der Zahl transmigrierender Lymphozyten erklärt werden.

4.4 Ausblick

Die KFO 179 (biologische Grundlage der individuellen Tumor-Antwort bei Patienten mit Rektumkarzinom) untersucht mit Unterstützung der DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) an der Universitätsmedizin Göttingen interdisziplinär den molekularbiologischen Hintergrund der Therapieerfolge bei einzelnen Patienten verbunden mit individuellen Nebenwirkungen. Ziel ist eine individualisierte Therapie des Rektumkarzinoms. Ergebnisse sollen helfen, Therapieerfolge und Nebenwirkungen zu antizipieren. Response(Wirkungs)- und Toxizitäts(Nebenwirkungs)-Scores könnten im Rahmen einer personalisierten Medizin eine adaptierte Therapie ermöglichen. Ziele sind ein größerer Therapieerfolg und eine höhere Lebensqualität der Patienten.

Für das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv wurden schon Daten veröffentlicht, die zum einen klinische Prädiktoren für das Ausmaß auftretender Akuttoxizität durch die neoadjuvante RCT (Wolff et al. 2011a) und zum anderen den Zusammenhang des Grades der Akuttoxizität mit dem Tumorregressionsgrad beschreiben (Wolff et al. 2010):

Wolff et al. beschrieben 2011 klinische Parameter wie Geschlecht und Body-Mass-Index als geeignete Indikatoren für individuelle Risikoprofile in Bezug auf Therapie-induzierte Toxizität. Die Untersuchung involvierte 196 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom (UICC-Stadium II und III) und multimodalem Therapiekonzept mit neoadjuvanter RCT, qualitätskontrollierter Tumorresektion (TME) nach onkologischen Kriterien und adjuvanter CTx. Die präoperative RTx erfolgte mit insgesamt 50,4 Gy und die neoadjuvante CTx bestand aus 5-FU in Monotherapie oder aus einem intensivierten Regime mit zusätzlich Oxaliplatin. Therapieinduzierte Akuttoxizität wurde wöchentlich erfasst und Toxizitäts-Grade ≥3 (CTC-Kriterien) für Hautreaktionen, Zystitis, Proktitis oder Enteritis wurden als höhergradige Organtoxizität gewertet. Wolff fand eine signifikant höhere Rate akuter Toxizität bei Patienten, die zusätzlich Oxaliplatin erhielten verglichen mit 5-FU-Monotherapie ($p=0,009$). Frauen mit niedrigem Body-Mass-Index wurden als Subgruppe mit höchstem Risiko für Akuttoxizität identifiziert. Die Ergebnisse könnten helfen, Patienten individualisierten Therapieschemata verschiedener Intensität zuzuführen (Wolff et al. 2011a).

Wolff fand 2010 im Rahmen des Teilprojektes 6 der KFO 179 „höhergradige akute Organtoxizität während präoperativer Radiochemotherapie als positive[n] Prädiktor für komplette histopathologische Regression in der multimodalen Behandlung von lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen“ (Wolff et al. 2010, S.30). „[Es] wurden 120 Patienten behandelt. Die präoperative Behandlung bestand aus einer normofraktionierten Radiotherapie

mit einer Gesamtdosis von 50,4 Gy und entweder zwei Zyklen 5-Fluorouracil (5-FU) oder zwei Zyklen 5-FU und Oxaliplatin. Die Toxizität während der Behandlung wurde wöchentlich untersucht. Jede Toxizität ≥Grad 2 nach CTC (Common Toxicity Criteria) in Form von Enteritis, Proktitis oder Zystitis wurde dabei als höhergradige Organtoxizität gewertet“ (Wolff et al. 2010, S. 30f). Wolff fand eine „signifikante Korrelation zwischen höhergradiger akuter Organtoxizität und kompletter Tumorregression, [...] unabhängig von anderen Faktoren wie z. B. dem präoperativen Chemotherapieregime. Die Wahrscheinlichkeit für die Patienten mit höhergradigen Nebenwirkungen, eine histopathologische Komplettremission zu entwickeln, war mehr als dreimal höher als für Patienten ohne Toxizität“ (Wolff et al. 2010, S.30).

Die Untersuchungen der KFO zielen darauf ab, Toxizität und Therapieerfolge individuell zu antizipieren zur Anpassung von Art und Intensität der multimodalen Therapie. In dieser Arbeit wurde geprüft, ob Patienten mit höherem Grad der Spätnebenwirkungen auch höhere MK-Ausbeuten zeigten. DNA-Schäden (untersucht mittels MNT) wurden im Rahmen der jährlichen NS zu denselben Zeitpunkten wie die Spättoxizität nach LENT/SOMA-Kriterien erfasst, so dass beide Variablen zu definierten Zeitpunkten und im Verlauf der NS in Beziehung zueinander gesetzt werden konnten.

Es fiel eine interindividuelle Variabilität der MK-Ausbeuten bei den NS auf, die durch biologische und klinische Faktoren (Patientenalter und –geschlecht, Bestrahlungsart, Größe von bestrahltem Rektumvolumen und Rektumzielvolumen, Zeitabstand der NS zum Ende der CTx bzw. zur Operation) nur zu einem kleinen Teil (Effekt des Geschlechts bei 1. NS) erklärt wurde. Gleichzeitig korrelierten die MK-Ausbeuten der beiden NS bei Betrachtung des Verlaufs einzelner Patienten (intraindividuell).

Die statistische Analyse zeigte bei der ersten NS für die Ausbeute an MK und den Grad der aufgetretenen Blasentoxizität (nach LENT/SOMA-Kriterien) einen statistisch signifikanten Zusammenhang. Patienten mit Spättoxizität (≥Grad 1) hatten signifikant höhere MK-Ausbeuten als Patienten ohne Spättoxizität (Grad 0).

Weitere Untersuchungen der KFO 179 könnten den Zusammenhang zwischen zytogenetischen Schäden und klinischen Faktoren auf der einen Seite und Therapieerfolgen und Nebenwirkungen auf der anderen Seite differenzierter darstellen. So könnten es weitere Erkenntnisse in Zukunft ermöglichen, all diese Variablen in Response(Wirkungs)- und Toxizitäts(Nebenwirkungs)-Scores zu integrieren und so Therapieerfolge und Nebenwirkungen schon vor Therapiebeginn oder während der Therapie zu antizipieren. Dies könnte in Zukunft eine individualisierte Tumortherapie ermöglichen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden 48 Patienten nach multimodaler Tumortherapie bei lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom im Rahmen der CAO/ARO/AIO-04-Studie untersucht. Die Patienten wurden neoadjuvant radiochemotherapiert und entweder in Arm A mit 5-FU (1. und 5. RTx-Woche, 1000 mg/m^2/Tag) oder in Arm B mit 5-FU und Oxaliplatin (5-FU Tag 1-14 und Tag 22-35, 250 mg/m^2/Tag; Oxaliplatin Tag 1,8,22,29, 50 mg/m^2/Tag) zusätzlich zur Bestrahlung mit 50,4 Gy (1,8 Gy/Tag; 3DCRT oder IMRT oder VMAT oder VMAT und 3DCRT) behandelt. Bei Nachsorgeuntersuchungen (NS) 1 und 2 Jahre nach Therapieende wurde die Spättoxizität nach LENT/SOMA-Kriterien erfasst. Blutproben wurden akquiriert zur Durchführung des Mikronukleustests (MNT), eines zuverlässigen und einfach durchführbaren Tests zur Darstellung genomischer Schäden in peripheren Blutlymphozyten (PBL). Innerhalb des Kollektivs trat eine interindividuelle Variabilität der Mikrokern(MK)-Ausbeuten auf, die nur zum Teil (Effekt des Geschlechts bei BE 1y) durch Patientenalter und -geschlecht, Bestrahlungsart und –volumina und Zeitpunkte der NS erklärt werden konnte. Bezogen auf einzelne Patienten traten im Verlauf der NS konstant hohe bzw. niedrige MK-Ausbeuten auf. Im Vorfeld konnte eine Zunahme der MK-Ausbeuten im Verlauf der RCT gezeigt werden (Helms 2010; Hennies 2010; Wolff et al. 2011b). Die MK-Ausbeuten waren jeweils 1 Jahr und 2 Jahre nach Ende der RCT signifikant ($p<0,0001$) über dem Level von vor Beginn der RCT. Die MK-Ausbeuten lagen bei beiden NS signifikant ($p<0,0001$) unter dem Level des Endes der RCT. Für die Gesamt-, Rektum- und Hautspättoxizität bestand keine Korrelation mit dem Ausmaß der MK-Ausbeuten. Die Befunde im Bereich der Blase sollten weiter beobachtet werden, da ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Blasenspättoxizität und den MK-Ausbeuten bei der 1. NS bestand.

Auf der einen Seite kann vermutet werden, dass genetische Faktoren (Radiosensitivität) interindividuelle Schwankungen der MK-Ausbeuten erklären könnten. Auf der anderen Seite könnten dezidiertere Kenntnisse der Einflussvariablen (z. B. integrale Dosis des Knochenmarks) zur Klärung beitragen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten die Kenntnis der Relation experimentell darstellbarer zytogenetischer Schäden und klinischer Folgen einer multimodalen Tumortherapie bei einzelnen Patienten verbessern.

6 Anhang: Tab. 15-21

Tabelle 15: LENT/SOMA-Kriterien für die Haut (LENT Conference 1995, S.1091)

	Grad 1	**Grad 2**	**Grad 3**	**Grad 4**
Rauigkeit	Asymptomatisch	Symptomatisch	Konstante Aufmerksamkeit benötigt	-
Empfindungen	Juckreiz, Hypersensitivität	Intermittierend Schmerz	Persistierend Schmerz	Stark einschränkende Störung
Ödeme	Asymptomatisch	Symptomatisch	Sekundäre Dysfunktion	Totale Dysfunktion
Haarausfall	Ausdünnung	Stellenweise, Permanent	Komplett, Permanent	-
Pigment-veränderung	Vorübergehend, leicht	Permanent, merklich	-	-
Ulzera/Nekrosen	Nur Epidermis	Bis in Dermis	Subkutan	Knochen liegt frei
Teleangiektasie	Gering	Moderat	Ausgeprägt	-
Fibrose/Narbe	Asymptomatisch	Symptomatisch	Sekundäre Dysfunktion	Totale Dysfunktion
Atrophie	Asymptomatisch	Symptomatisch	Sekundäre Dysfunktion	Totale Dysfunktion
Trockenheit	-	-	Medikamente nötig	
Empfindungen	-	Intermittierend Medikamente	Kontinuierlich Medikamente	Chirurgische Intervention
Ulzera	-	-	Medikamente nötig	Chirurgische Intervention
Ödeme	-	-	Medikamente nötig	Chirurgische Intervention
Fibrose/Narbe	-	-	Medikamente nötig	Chirurgische Intervention
Farbfotographien	Erkennen von Veränderungen der Erscheinung			

(doppelte Striche trennen die Einteilung in subjektiv, objektiv, Management und Analytik)

Tabelle 16: LENT/SOMA-Kriterien für das Rektum (LENT Conference 1995, S.1073)

	Grad 1	**Grad 2**	**Grad 3**	**Grad 4**
Tenesmen	Gelegentlicher Drang	Intermittierender Drang	Persistierender Drang	Refraktärer Drang
Schleimhaut-abgang	Gelegentlich	Intermittierend	Persistierend	Refraktär
Sphinkter-kontrolle	Gelegentlich	Intermittierend	Persistierend	Refraktär
Stuhlfrequenz	2-4/d	4-8/d	>8/d	Unkontrollierte Diarrhö
Schmerz	Gelegentlich, milde	Intermittierend, tolerierbar	Persistierend, intensiv	Refraktär, quälend
Blutung	Okkult	>2x/Woche	Täglich	Ausgeprägt
Ulzeration	Superfiziell ≤1 cm^2	Superfiziell ≥1 cm^2	Tiefes Ulkus	Perforation, Fistel
Striktur	>2/3 des normalen Durchmessers mit Dilatation	1/3-2/3 des normalen Durchmessers mit Dilatation	<1/3 des normalen Durchmessers	Komplette Obstruktion
Tenesmen/ Stuhlfrequenz	≤2 Antidiarrhoika pro Woche	>2 Antidiarrhoika pro Woche	>2 Antidiarrhoika pro Tag	Chirurgische Intervention/ Permanent Kolostomie
Schmerz	Gelegentlich Medikamente (nicht-narkotisch)	Regelmäßig Medikamente (nicht-narkotisch)	Regelmäßig Medikamente (narkotisch)	Chirurgische Intervention
Blutung	Gabe von Stuhlweich-macher, Eisentherapie	Gelegentlich Transfusion	Regelmäßig Transfusion	Chirurgische Intervention/ Permanent Kolostomie
Ulzeration	Diät-modifikation, Stuhlweich-macher	Gelegentlich Steroide	Steroide per Klysma, hyperbarer Sauerstoff	Chirurgische Intervention/ Permanent Kolostomie

Striktur	Diätmodifikation	Gelegentlich Dilatation	Regelmäßig Dilatation	Chirurgische Intervention/ Permanent Kolostomie
Sphinkter-kontrolle	Gelegentlich Einlagen nötig	Intermittierend Einlagen	Persistierend Einlagen	Chirurgische Intervention/ Permanent Kolostomie
Proktoskopie	Zugang zu Lumen und mukosaler Oberfläche			
CT	Zugang zu Wanddicke, Höhlen- und Fistelbildung			
MRT	Zugang zu Wanddicke, Höhlen- und Fistelbildung			
Anal-manometrie	Erfassung der Druckcharakteristika des anorektalen Systems			
Ultraschall	Zugang zu Wanddicke und Fistelformation			

(doppelte Striche trennen die Einteilung in subjektiv, objektiv, Management und Analytik)

Tabelle 17: LENT/SOMA-Kriterien für Blase und Urethra (LENT Conference 1995, S.1077)

	Grad 1	**Grad 2**	**Grad 3**	**Grad 4**
Dysurie	Gelegentlich, minimal	Intermittierend, tolerabel	Persistierend, intensiv	Refraktär, quälend
Frequenz	Intervalle 3-4h	Intervalle 2-3h	Intervalle 1-2h	Stündlich
Hämaturie	Gelegentlich	Intermittierend	Persistierend, mit Koagel	Refraktär
Inkontinenz	<wöchentlich	<täglich	≤2 Unterlagen pro Unterwäsche und Tag	Refraktär
Abgeschwächter Strahl	Gelegentlich, milde	Intermittierend	Persistierend, inkomplett	Komplette Obstruktion
Hämaturie	Mikroskopisch, Hb normal	Intermittierend makroskopisch, <10% Hb-Abfall	Persistierend makroskopisch, 10-20% Hb-Abfall	Refraktär, >20% Hb-Abfall
Endoskopie	Stellenweise Atrophie oder Teleangiektasie ohne Blutung	Konfluierende Atrophie oder Teleangiektase mit Blutung	Ulzerationen in den Muskel	Perforation, Fistel
Maximalvolumen	>300-400 cm^3	>200-300 cm^3	>100-200 cm^3	≤100 cm^3
Residualvolumen	25 cm^3	>25-100 cm^3	>100 cm^3	-
Dysurie	Gelegentlich Medikamente (nicht-narkotisch)	Regelmäßig Medikamente (nicht-narkotisch)	Regelmäßig Medikamente (narkotisch)	Chirurgischer Eingriff
Frequenz	Medikamentöse Alkalisierung	Gelegentlich Spasmolytika	Regelmäßig Narkotika	Zystektomie
Hämaturie	Eisentherapie	Gelegentlich Transfusion oder Einzel-Kauterisation	Oft Transfusion oder Koagulation	Chirurgischer Eingriff

Inkontinenz	Gelegentlich Inkontinenz-einlagen nötig	Intermittierend Inkontinenz-einlagen	Regelmäßig Einlagen oder Selbst-Katheterisierung	Permanente Katheterisierung
Abgeschwächter Strahl	-	<1x/d Selbst-Katheterisierung	>1x/d Selbst-Katheterisierung, Dilatation	Permanent Katheter, chirurgischer Eingriff
Zystographie	Zugang zu Schleimhautoberfläche			
Volumetrik	Zugang zu Blasenkapazität in Millilitern			
KM-Röntgen	Zugang zu Ulzera, Kapazität und Kontraktilität			
Ultraschall	Zugang zu Wanddicke, Höhlen- und Fistelbildung			
Elektro-myografie	Zugang zu Sphinkteraktivität mit intraluminalem Druckwandler, Kontraktionsdruck und Volumenkurven			

(doppelte Striche trennen die Einteilung in subjektiv, objektiv, Management und Analytik)

Tabelle 18: MK, NPB und Proliferationsindizes bei Blutentnahme 1y

Pat.	3K*	3K	4K*	4K	1 MK	2 MK	3 MK	4 MK	MK ges.	NPB	NDI	NDCI
1												
2												
3	7	24	32	61	84	24	3	2	0,149	0,018	1,34	1,21
4	4	18	46	105	50	10	4	0	0,082	0,011	1,51	1,30
5	4	5	34	58	103	30	5	1	0,182	0,018	1,47	1,36
6	11	35	29	106	43	7	4	3	0,081	0,009	1,50	1,36
7	1	11	27	57	41	7	3	0	0,064	0,007	1,41	1,27
8	9	10	14	35	67	21	2	0	0,115	0,01	1,34	1,22
9	6	11	36	103	70	14	3	0	0,107	0,007	1,69	1,54
10	2	7	22	69	51	7	0	1	0,069	0,004	1,29	1,20
11												
12	5	9	15	56	52	14	3	0	0,089	0,007	1,36	1,20
13	0	3	2	26	39	6	1	0	0,054	0,003	1,54	1,38
14	6	13	32	73	40	11	5	1	0,081	0,006	1,45	1,32
15	5	4	14	53	70	15	0	0	0,1	0,009	1,80	1,58
16	1	9	21	53	69	9	1	0	0,09	0,007	1,37	1,21
17	5	12	13	32	32	4	0	0	0,04	0,003	1,60	1,44
18	4	21	31	88	46	7	1	1	0,067	0,004	1,36	1,23
19	3	7	41	108	58	12	2	1	0,092	0,006	1,44	1,25
20	4	13	20	75	59	5	0	0	0,069	0,005	1,34	1,16
21	4	13	19	73	51	10	0	0	0,071	0,005	1,38	1,21
22	5	9	5	10	57	11	1	0	0,082	0,005	1,15	1,08
23	2	11	6	23	46	4	0	0	0,054	0,007	1,33	1,21
24	8	31	21	99	60	11	2	1	0,092	0,009	1,49	1,25
25	3	18	26	42	64	13	2	0	0,096	0,011	1,42	1,31
26	8	7	29	62	79	13	4	0	0,117	0,01	1,66	1,47
27	4	10	15	39	41	6	0	0	0,053	0,006	1,60	1,35
28	1	6	18	40	13	8	1	1	0,036	0,005	1,54	1,31
29	6	15	44	132	34	6	2	0	0,052	0,004	1,86	1,54
30	0	6	13	41	23	4	0	0	0,031	0,005	1,35	1,25
31												
32	8	10	42	99	87	20	1	1	0,134	0,015	1,58	1,37
33	3	6	30	72	23	6	0	0	0,035	0,003	1,88	1,67
34	5	14	16	54	66	15	1	0	0,099	0,013	1,18	1,12
35	2	3	15	43	47	9	0	0	0,065	0,006	1,44	1,35
36	3	10	23	75	60	19	11	1	0,135	0,014	1,25	1,12
37	8	21	38	78	104	34	5	4	0,203	0,016	1,10	1,07
38	1	2	8	31	31	12	2	0	0,061	0,008	1,49	1,31
39												
40	1	6	2	22	58	7	1	0	0,075	0,009	1,36	1,29
41	12	23	21	93	39	14	2	0	0,073	0,007	1,66	1,42
42	5	16	17	63	45	7	4	0	0,071	0,006	1,31	1,20
43	4	14	16	34	62	26	5	0	0,129	0,009	1,38	1,28
44	5	4	40	69	62	21	5	2	0,127	0,01	1,87	1,60
45	5	13	30	49	19	4	1	0	0,03	0,005	1,71	1,52
46	0	2	7	22	44	12	0	0	0,068	0,006	1,54	1,40
47	1	11	16	47	51	8	3	0	0,076	0,009	1,38	1,24
48	0	3	28	55	39	16	1	0	0,074	0,007	1,72	1,64

(Pat.: Patient; jeweils pro 1000 binukleärer Lymphozyten (BLZ): 3K: Trinukleäre mit Schaden; 3K: Trinukleäre ohne Schaden; 4K*: Tetranukleäre mit Schaden; 4K: Tetranukleäre ohne Schaden; 1 MK: BLZ mit 1 Mikrokern etc.; MK ges.: MK/1000BLZ; NPB: Nukleopasmabrücken/1000BLZ; NDI: Nuclear Division Index; NDCI: Nuclear Division Cytotoxicity Index)*

Tabelle 19: MK, NPB und Proliferationsindizes bei Blutentnahme 2y

Pat.	3K*	3K	4K*	4K	1 MK	2 MK	3 MK	4 MK	MK ges.	NPB	NDI	NDCI
1	0	8	14	71	28	4	0	0	0,036	0,005	1,65	1,43
2	10	19	40	123	31	2	1	0	0,038	0,005	1,73	1,45
3	2	4	19	22	45	11	4	1	0,083	0,01	1,23	1,16
4	3	7	32	82	24	8	1	0	0,043	0,005	1,73	1,40
5	4	15	11	23	50	3	2	0	0,062	0,007	1,34	1,22
6	1	20	14	55	30	3	0	0	0,036	0,005	1,33	1,17
7	4	6	11	33	27	1	0	0	0,029	0,004	1,68	1,48
8	2	2	11	25	33	8	0	0	0,049	0,006	1,64	1,50
9	1	11	35	108	26	5	1	1	0,043	0,002	1,61	1,41
10	1	7	2	29	13	2	0	0	0,017	0,003	1,45	1,29
11	0	1	41	46	25	8	2	0	0,047	0,005	1,59	1,38
12	1	7	9	39	20	2	1	0	0,027	0,003	1,48	1,32
13	2	7	41	64	29	3	3	0	0,044	0,004	1,48	1,31
14	0	3	20	55	26	11	2	0	0,054	0,004	1,76	1,64
15												
16	6	18	15	52	49	4	1	0	0,06	0,006	1,48	1,35
17	0	3	10	41	17	3	1	0	0,026	0,002	1,62	1,56
18	0	2	7	27	12	2	0	0	0,016	0,001	1,64	1,53
19	6	4	26	44	47	16	2	0	0,085	0,004	1,26	1,18
20	2	9	27	85	26	6	0	0	0,038	0,004	1,63	1,47
21												
22	1	4	10	21	18	0	0	0	0,018	0,004	1,26	1,19
23	2	8	7	37	13	2	0	0	0,017	0,002	1,53	1,40
24												
25												
26												
27												
28												
29												
30												
31	6	13	14	93	19	8	2	0	0,041	0,002	1,55	1,38
32	2	6	25	86	24	6	0	0	0,036	0,005	1,61	1,33
33	2	11	41	68	23	3	0	0	0,029	0,002	1,76	1,49
34												
35	0	5	3	10	23	3	2	0	0,035	0,004	1,50	1,37
36	7	13	33	60	34	5	1	0	0,047	0,004	1,68	1,47
37	1	9	12	36	47	7	2	0	0,067	0,007	1,12	1,11
38	0	1	9	35	14	2	0	0	0,018	0,007	1,58	1,45
39	3	18	7	36	30	7	0	0	0,044	0,006	1,62	1,30
40	2	4	11	20	33	3	0	0	0,039	0,004	1,46	1,44
41	2	2	18	60	18	1	0	0	0,02	0,004	1,44	1,36
42												
43												
44												
45												
46												
47												
48												

(Pat.: Patient; jeweils pro 1000 binukleärer Lymphozyten (BLZ): 3K: Trinukleäre mit Schaden; 3K: Trinukleäre ohne Schaden; 4K*: Tetranukleäre mit Schaden; 4K: Tetranukleäre ohne Schaden; 1 MK: BLZ mit 1 Mikrokern etc.; MK ges.: MK/1000BLZ; NPB: Nukleopasmabrücken/1000BLZ; NDI: Nuclear Division Index; NDCI: Nuclear Division Cytotoxicity Index)*

Tabelle 20: Grad der Spättoxizität der Studienpatienten nach LENT/SOMA-Kriterien

Patient	Spättoxizität Haut	Spättoxizität Rektum	Spättoxizität Blase	Sonstige Toxizität	Gesamttoxizität
1	0	0	1		1
2	0	0	0		0
3	0	3	3		3
4	0	0	0		0
5	0	0	0		0
6	0	0	3		3
7	2	2	0	1 (Enteritis)	2
8	0	0	0		0
9	0	0	3		3
10	0	0	0		0
11	0	0	0		0
12	0	0	0	2 (Enteritis)	2
13	0	1	0		1
14	1	0	0		1
15	0	0	1		1
16	0	0	0		0
17	0	0	0	1 (Enteritis)	1
18	0	2	3		3
19	0	2	0	3 (Enteritis)	3
20	0	0	0		0
21	0	0	0		0
22	0	0	0		0
23	1	4	0		4
24	0	0	0		0
25	0	0	0		0
26					
27	0	0	0		0
28	0	0	0		0
29	0	0	0		0
30	0	0	0		0
31	0	0	0		0
32	0	1	0		1
33	0	0	0		0
34	0	0	0		0
35	0	0	0		0
36	0	0	0		0
37	0	2	2		2
38	0	0	0	2 (Enteritis)	2
39	0	0	4		4
40	0	0	0		0
41	0	0	0		0
42	0	0	0		0
43	0	0	1		1
44	0	0	3		3
45	0	0	0	2 (Nephrotoxizität)	2
46	0	0	4		4
47	0	1	0		1
48	0	2	0		2

(Gesamttoxizität: höchster Grad der Spättoxizität eines einzelnen Organs)

Tabelle 21: Bestrahlungsart und Bestrahlungsvolumina

Patient	Bestrahlungsart	Rektumzielvolumen-Erfassung [cm^3]	Rektumvolumen [cm^3]
1	3D	5127	2202
2	3D	5145	2117
3	3D	5137	1908
4	3D	5206	1382
5	3D	5085	1652
6	3D	5175	1357
7	3D	5210	1110
8	3D	5160	1037
9	3D	5168	1393
10	3D	5144	1165
11	3D	5089	1115
12	3D	5141	1099
13	3D	5093	1126
14	3D	5127	1456
15	3D	4746	1177
16	3D	5204	1292
17	3D	5134	1370
18	3D	5150	1240
19	3D	5094	1380
20	3D	5079	1204
21	3D	5100	1548
22	3D	5031	2450
23	3D	5132	1536
24	3D	5151	1164
25	3D	5072	1232
26	3D	5171	1253
27	VMAT	5201	1372
28	3D	5099	1247
29	3D+VMAT	5169	1168
30	3D+VMAT	5194	1433
31	3D	5213	1916
32	3D	5221	2137
33	3D	5139	1176
34	3D	5141	1113
35	3D	5174	999
36	3D	5160	1418
37	3D	5194	1764
38	3D	5125	1670
39	3D	5120	1674
40	3D	5116	1180
41	3D	5216	1399
42	3D	5167	1537
43	3D	4993	1118
44	IMRT	5103	1530
45	3D	5181	1435
46	VMAT	4975	1730
47	3D	5085	1545
48	VMAT	5070	1217

(3D: 3D-konformale Bestrahlung; VMAT: volumetric modulated arc therapy; IMRT: intensitätsmodulierte Radiotherapie)

7 Literaturverzeichnis

Arbea L, Ramos LI, Martínez-Monge R, Moreno M, Aristu J (2010): Intensity-modulated radiation therapy (IMRT) vs. 3D conformal radiotherapy (3DCRT) in locally advanced rectal cancer (LARC): dosimetric comparison and clinical implications. Radiat Oncol 26;5:17.

Awa AA, Sofuni T, Honda T, Itoh M, Neriishi S, Otake M (1978): Relationship between the radiation dose and chromosome aberrations in atomic bomb survivors of Hiroshima and Nagasaki. J Radiat Res 19:126-140.

Beninson D, Lloyd DC, Natarajan AT, Obe G, Preston RJ, Sasaki MS: Biological dosimetry: chromosomal aberration analysis for dose assessment (Technical Report Series 260); International Atomic Energy Agency, Vienna 1986.

Bertz J, Hentschel S, Stabenow R, Giersiepen K, Kaatsch P, Stegmaier C, Haberland J, Katalinic A, Ziegler H: Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und Robert Koch-Institut, Saarbrücken 2006.

Bogen KT (1993): Reassessment of human peripheral T-lymphocyte lifespan deduced from cytogenetic and cytotoxic effects of radiation. Int J Radiat Biol 64:195-204.

Bonassi S, Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Bigatti P, Camurri L, Dalpra L, De Ferrari M, Forni A, Lando C et al. (1995): Influence of sex on cytogenetic end points: evidence from a large human sample and review of the literature. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 4:671-679.

Bölke E, Wettstein M, Budach W (2005): Neoadjuvante und adjuvante Radio- und Radiochemotherapie beim Rektumkarzinom. Onkologe 11:822-831.

Bruheim K, Guren MG, Skovlund E, Hjermstad MJ, Dahl O,Frykholm G, Carlsen E, Tveit KM (2010): Late side effects and quality of life after radiotherapy for rectal cancer. Int J Radiat Biol 76**:**1005-1011.

Camma C, Giunta M, Fiorica F, Pagliaro L, Craxi A, Cottone M (2000): Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: A meta-analysis. JAMA 284**:**1008-1015.

Catena C, Conti D, Parasacchi P, Marenco P, Bortolato B, Botturi M, Leoni M, Portaluri M, Paleani-Vettori PG, Righi E (1996): Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes may predict patient response to radiotherapy. Int J Radiat Biol 70**:**301-308.

Catena C, Conti D, Trenta G, Righi E, Breuer F, Melacrinis FF, Montesano T, Ventroni G, Ronga G (2000): Micronucleus yield and colorimetric test as indicators of damage in patients' lymphocytes after 131I therapy. J Nucl Med 41:1522-4.

CCCG (2001): Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8,507 patients from 22 randomised trials. Lancet 358**:**1291-1304.

Cedermark B, Johansson H, Rutqvist LE, Wilking N (1995): The Stockholm I trial of preoperative short term radiotherapy in operable rectal carcinoma. A prospective randomized trial. Stockholm Colorectal Cancer Study Group. Cancer 75**:**2269-2275.

Chen Y, Jin CZ, Zhang XQ, Ge SL, Zhang ZY, Xu H, Liu XL, Wu DC, Zhou PK (2009): Seventeen-year follow-up study on chromosomal aberrations in five victims accidentally exposed to several Gy of 60Co [gamma]-rays. Radiat Environ Biophys 48:57-65.

Chui CS, LoSasso T, Spirou S (1994): Dose calculation for photon beams with intensity modulation generated by dynamic jaw or multileaf collimators. Med Phys 21:1237-1244.

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 (EORTC). Int J Radiat Oncol Biol Phys 31:1341-1346.

Cristy M (1981): Active bone marrow distribution as a function of age in humans. Phys Med Biol 26:389-400.

Crott JW, Mashiyama ST, Ames BN, Fenech M (2001): The effect of folic acid deficiency and MTHFR C677T polymorphism on chromosome damage in human lymphocytes in vitro. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 10**:**1089-1096.

D'Alesio V, Pacelli R, Durante M, Canale Cama G, Cella L, Gialanella G, Grossi G, Pugliese M, Punzo G, Sardi I et al. (2003): Lymph nodes in the irradiated field influence the yield of radiation-induced chromosomal aberrations in lymphocytes from breast cancer patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys 57:732-8.

Dukes CE, Bussey HJ (1958): The Spread of Rectal Cancer and its Effect on Prognosis. Br J Cancer 12: 309–320.

Durante M, Yamada S, Ando K, Furusawa Y, Kawata T, Majima H, Nakano T, Tsujii H (1999): Measurements of the equivalent whole-body dose during radiation therapy by cytogenetic methods. Phys Med Biol 44:1289-98.

Dutreix J, Girinski T, Cosset JM, Bernard A, Pico J, Baume D, Bayle C, Benk V (1987): Blood cell kinetics and total body irradiation. Radiother Oncol 9**:**119-129.

Eastmond DA, Tucker JD (1989): Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. Environ Mol Mutagen 13:34-43.

Enker WE, Thaler HT, Cranor ML, Polyak T (1995): Total mesorectal excision in the operative treatment of carcinoma of the rectum. J Am Coll Surg 181**:**335-346.

Evans HJ, Neary GJ, Williamson FS (1959): The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on Vicia faba roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. Int J Radiat Biol 1**:**216-229.

Fenech M (1993): The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mutat Res 285**:**35-44.

Fenech M (1998): Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes- a biomarker for DNA damage in human populations. Mutat Res 404**:**155-165.

Fenech M (2000): The in vitro micronucleus technique. Mutat Res 455**:**81-95.

Fenech M (2005): In Vitro Micronucleus Technique to Predict Chemosensitivity. Methods Mol Med 111:3-32.

Fenech M (2007): Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nat Protoc 2**:**1084-1104.

Fenech M, Morley AA (1985a): Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat Res 147**:**29-36.

Fenech M, Morley AA (1985b): The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. Mutat Res 148:99-105.

Fenech M, Morley AA (1986): Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. Mutat Res 161**:**193-198.

Fenech M, Rinaldi J (1994): The relationship between micronuclei in human lymphocytes and plasma levels of vitamin C, vitamin E, vitamin B12 and folic acid. Carcinogenesis 15**:**1405-1411.

Fenech M, Rinaldi J (1995): A comparison of lymphocyte micronuclei and plasma micronutrients in vegetarians and non-vegetarians. Carcinogenesis 16**:**223-230.

Fenech M, Denham J, Francis W, Morley A (1990): Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy. Int J Radiat Biol 57:373-383.

Fenech M, Perepetskaya G, Mikhalevich L (1997): A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations--experiences from the Chernobyl catastrophe. Environ Mol Mutagen 30:112-8.

Fisher B, Wolmark N, Rockette H, Redmond C, Deutsch M, Wickerham DL, Fisher ER, Caplan R, Jones J, Lerner H et al. (1988): Postoperative adjuvant chemotherapy or radiation therapy for rectal cancer: results from NSABP protocol R-01. J Natl Cancer Inst 80**:**21-29.

Fritzenschaf H, Kohlpoth M, Rusche B, Schiffmann D (1993): Testing of known carcinogens and noncarcinogens in the Syrian hamster embryo (SHE) micronucleus test in vitro; correlations with in vivo micronucleus formation and cell transformation. Mutat Res 319**:**47-53.

Gamulin M, Kopjar N, Grgić M, Ramić S, Viculin T, Petković M, Garaj-Vrhovac V (2010): Cytogenetic follow-up in testicular seminoma patients exposed to adjuvant radiotherapy. Coll Antropol 34:455-65.

Gérard JP, Conroy T, Bonnetain F, Bouché O, Chapet O, Closon-Dejardin MT, Untereiner M, Leduc B, Francois E, Maurel J et al. (2006): Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. J Clin Oncol 24:4620-4625.

Ghadirian P, Lacroix A, Maisonneuve P, Perret C, Potvin C, Gravel D, Bernard D, Boyle P (1997): Nutritional factors and colon carcinoma: a case-control study involving French Canadians in Montreal, Quebec, Canada. Cancer 80:858-864.

GITSG (1985): Prolongation of the disease-free interval in surgically treated rectal carcinoma. Gastrointestinal Tumor Study Group. N Engl J Med 312:1465-1472.

Graeven U, Schmiegel W: Tumoren des Dünn- und Dickdarms; in: Innere Medizin; hrsg. Berdel WE, Böhm M, Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Schmiegel W; 5.Auflage; Urban&Fischer, München 2004, 1233-1240.

Gutiérrez S, Carbonell E, Galofréa P, Xamena N, Creus A, Marcos R (1995): A cytogenetic follow-up study of thyroid cancer patients treated with 131I. Cancer Lett 91:199-204.

Han T, Dadey B (1978): T-lymphocyte dependency of B-lymphocyte blastogenic response to phytomitogens. Immunology 34:625-629.

Hartel C, Nikoghosyan A, Durante M, Sommer S, Nasonova E, Fournier C, Lee R, Debus J, Schulz-Ertner D, Ritter S (2010): Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of prostate cancer patients treated with IMRT and carbon ions. Radiother Oncol 95:73-8.

Heddle JA (1973): A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutat Res 18:187-190.

Heinze B, Arnold R, Rutzen-Loesevitz L, Fliedner TM (1995): The role of stable chromosome aberrations as biological indicators of radiation effect: studies in patients after total body irradiation and bone marrow transplantation. Stem Cells 13:191-8.

Helms C, Göttingen: persönliche Mitteilungen 2010.

Hennies S: Vergleich von Mikronukleus- und Chromosomenaberrationstechnik bei der Dokumentation zytogenetischer Schäden in neoadjuvant radio-chemotherapierten Rektumkarzinompatienten. Med. Diss. Göttingen 2010.

Herfarth K, Kraus-Tiefenbacher U: Kolorektales Karzinom; in: Strahlentherapie kompakt, 2.Auflage; hrsg. Lohr F, Wenz F; Urban & Fischer Verlag/Elsevier, München 2007.

Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, Wagner G, Wittekind C: TNM Atlas. Illustrated guide to the TNM/pTNM Classification of malignant tumours. 4th edn, 2nd rev, Springer, Berlin Heidelberg New York 1999.

Herrmann T, Baumann B: Klinische Strahlenbiologie, Gustav Fischer Verlag, Jena 1997.

Higgins GA Jr, Conn JH, Jordan PH Jr, Humphrey EW, Roswit B, Keehn RJ (1975): Preoperative radiotherapy for colorectal cancer. Ann Surg 181:624-31.

Hille A, Hofman-Hüther H, Kühnle E, Wilken B, Rave-Fränk M, Schmidberger H, Virsik P (2010): Spontaneous and radiation-induced chromosomal instability and persistence of chromosome aberrations after radiotherapy in lymphocytes from prostate cancer patients. Radiat Environ Biophys 49:27-37.

Hofheinz RD, Wenz F, Post S, Matzdorff A, Laechelt S, Hartmann JT, Müller L, Link H, Moehler M, Kettner E et al. (2012): Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. Lancet Oncol 13:579-88.

Jensen JB, Ulhøi BP, Jensen KM (2010): Size and volume of metastatic and non-metastatic lymph nodes in pelvis and lower abdomen in patients with carcinoma of the bladder undergoing radical cystectomy. Scand J Urol Nephrol 44:291-7.

Jianlin L, Jiliang H, Lifen J, Wei Z, Baohong W, Hongping D (2004): Measuring the genetic damage in cancer patients during radiotherapy with three genetic end-points. Mutagenesis 19:457-64.

Junginger T, Hermanek P (2008): Problems in the treatment of upper rectal carcinoma. Chirurg 79:327-339.

Kaiser N: Einschluss von 5-Fluorouracil (5-FU) in vesikuläre Phospholipidgele: in vitro und in vivo Untersuchungen zur Stabilität, Pharmakokinetik und antitumoralen Wirksamkeit. Naturwiss. Diss. Schweinfurt 2003.

Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlman L, Glimelius B, van Krieken JH et al. (2001): Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. N Engl J Med 345: 638-646.

Keulers RA, de Roon AR, de Roode S, Tates AD (1998): The induction and analysis of micronuclei and cell killing by ultraviolet-B radiation in human peripheral blood lymphocytes. Photochem Photobiol 67**:**426-432.

Klein P, Schlag PM, Stelzner F, Sterk P: Das Rektumkarzinom, 1.Auflage; Urban & Fischer Verlag/Elsevier, München 2003, 90-96.

Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand HS, Collins RT, Beart RW, Kubista TP, Poon MA, Meyers WC, Mailliard JA et al. (1991): Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. N Engl J Med 324**:**709-715.

Lee R, Yamada S, Yamamoto N, Miyamoto T, Ando K, Durante M, Tsujii H (2004): Chromosomal aberrations in lymphocytes of lung cancer patients treated with carbon ions. J Radiat Res 45:195-9.

Lee TK, Allison RR, O'Brien KF, Naves JL, Karlsson UL, Wiley AL (2002): Persistence of micronuclei in lymphocytes of cancer patients after radiotherapy. Radiat Res 157:678-84.

Lee TK, Allison RR, O'Brien KF, Johnke RM, Christie KI, Naves JL, Kovacs CJ, Arastu H, Karlsson UL (2003): Lymphocyte radiosensitivity correlated with pelvic radiotherapy morbidity. Int J Radiat Oncol Biol Phys 57:222-9.

LENT Conference (1995): LENT SOMA for all anatomic sites. Int J Radiat Oncol Biol Phys 31:1049-1091.

Léonard D, Colin JF, Remue C, Jamart J, Kartheuser A (2012): Transanal endoscopic microsurgery: long-term experience, indication expansion, and technical improvements. Surg Endosc 26:312-22.

Lipp HP (1999): Adjuvante und palliative Therapie des Kolonkarzinoms Krankenhauspharmazie (20. Jahrgang) 10:414-34.

Littlefield LG, Sayer AM, Frome EL (1989): Comparisons of dose-response parameters for radiation-induced acentric fragments and micronuclei observed in cytokinesis-arrested lymphocytes. Mutagenesis 4**:**265-270.

Liu Q, Cao J, Liu Y, Lü YM, Qin B, Jiang B, Jiang LP, Fu BH, Zhao FL, Jiang EH et al. (2010): Follow-up study by chromosome aberration analysis and micronucleus assays in victims accidentally exposed to 60Co radiation. Health Phys 98:885-8.

McGarry CK, Butterworth KT, Trainor C, O'Sullivan JM, Prise KM, Hounsell AR (2010): Temporal characterization and in vitro comparison of cell survival following the delivery of 3D-conformal, intensity-modulated radiation therapy (IMRT) and volumetric modulated arc therapy (VMAT). Phys Med Biol 56:2445-57.

Midgley R, Kerr D (1999): Colorectal cancer. Lancet 353**:**391-399.

Mitteilungen der Deutschen Krebsgesellschaft (1994): Konsensus der CAO, AIO und ARO der Deutschen Krebsgesellschaft zur adjuvanten Therapie bei Kolon- und Rektumkarzinomen vom 11. März 1994. Strahlenther Onkol 170: 427-436.

Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH et al. (1990): Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. N Engl J Med 322**:**352-358.

Müller RP, Seegenschmiedt MH, Höffken K, Junginger T, Sauer HJ (2000): LENT-SOMA-Kriterien: Interdisziplinäre Bewertung von langfristigen Therapiefolgen in der Onkologie. Dt Ärztebl 97: A 2395–2401.

Murray A, Hunt T: The cell cycle. Oxford University Press, New York 1993, 251.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M: Chemotherapie maligner Tumoren; in: Mutschler-Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2001, 873-908.

National Cancer Institute (2010): CTCAE Files. [Online im Internet:] URL: http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/About.html [Stand: 17.05.2012, 15:01]

NGTATG (1992): Expectancy or primary chemotherapy in patients with advanced asymptomatic colorectal cancer: a randomized trial. J Clin Oncol 10**:**904-911.

NIH (1990): NIH consensus conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. JAMA 264**:**1444-1450.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005): Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 55**:**74-108.

Pinsk I, Phang PT (2007): Total mesorectal excision and management of rectal cancer. Expert Rev Anticancer Ther 7**:**1395-1403.

Pizzorno G, Handschumacher RE, Cheng YC: Pyrimidine and Purine Antimetabolites; in: Cancer Medicine, 4th Edition; hrsg. Holland JF, Frei E, Bast RC, Kufe DW, Morton DL and Weichselbaum RR; Lea&Febiger, Philadelphia 1997, 924-948.

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 34:378-83.

Ramalho A, Sunjevaric I, Natarajan AT (1988): Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: comparison of two methods. Mutat Res 207**:**141-146.

Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E (1998): Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. Ann Oncol 9**:**1053-1071.

RKI: Amtliche Todesursachenstatistik; Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2000.

Roberts-Thomson IC, Ryan P, Khoo KK, Hart WJ, McMichael AJ, Butler RN (1996): Diet, acetylator phenotype, and risk of colorectal neoplasia. Lancet 347**:**1372-1374.

Rödel C, Fietkau R, Keilholz L, Grabenbauer GG, Kessler, H, Martus P, Sauer R (1997): Akuttoxizität der simultanen Radiochemotherapie des Rektumkarzinoms. Strahlenther Onkol 173:415-21.

Rödel C, Liersch T, Hermann RM, Arnold D, Reese T, Hipp M, Fürst A et al. (2007): Multicenter Phase II Trial of Chemoradiation With Oxaliplatin for Rectal Cancer. J Clin Oncol 25:110-7.

Rödel C, Liersch T, Becker H, Fietkau R, Hohenberger W, Hothorn T, Graeven U, Arnold D, Lang-Welzenbach M, Raab HR et al.; on behalf of the German Rectal Cancer Study Group (2012): Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with fluorouracil and oxaliplatin versus fluorouracil alone in locally advanced rectal cancer: initial results of the German CAO/ARO/AIO-04 randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 13:679-687.

Roh MS, Colangelo LH, O'Connell MJ, Yothers G, Deutsch M, Allegra CJ, Kahlenberg MS, Baez-Diaz L, Ursiny CS, Petrelli NJ et al. (2009): Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03. J Clin Oncol 27**:**5124-5130.

Rubin P, Constine LS 3rd, Fajardo LF et al. (1995): EORTC Late Effects Working Group. Overview of late effects normal tissues (LENT) scoring system. Radiother Oncol 35:9-10.

Saris CP, van de Vaart PJ, Rietbroek RC, Blommaert FA (1996): In vitro formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells. Carcinogenesis 17**:**2763-2769.

Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF et al. (2004): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. N Engl J Med 351**:**1731-1740.

Schaefer C, Dietl B, Koelbl O (2007): Lokal fortgeschrittenes Rektumkarzinom. Onkologe 13:271-274.

Schmid W (1975): The micronucleus test. Mutat Res 31**:**9-15.

Schmidberger H, Virsik-Koepp P, Rave-Fränk M, Reinosch Karl-Robert et al. (2001): Reciprocal translocations in patients with testicular seminoma before and after radiotherapy. Int J Radiation Oncology Biol Phys 50: 857-864.

Schmiegel W, Pox A, Reinacher-Schick G et al. (2008): Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008. Z Gastroenterol 46:799-840.

Sevan'kaev AV, Lloyd DC, Edwards AA, Khvostunov IK, Mikhailova GF, Golub EV, Shepel NN, Nadejina NM, Galstian IA, Nugis VY et al. (2005): A cytogenetic follow-up of some highly irradiated victims of the Chernobyl accident. Radiat Protect Dosim 113:152-161.

Sinn HP, Hermanek P, Wagner G, Wittekind CH: Organspezifische Tumordokumentation; Deutsche Krebsgesellschaft e. V., Heidelberg 2003.

SRCT (1997): Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. Swedish Rectal Cancer Trial. N Engl J Med 336**:**980-987.

Stocchi L, Nelson H, Sargent DJ, O'Connell MJ, Tepper JE, Krook JE, Beart R Jr (2001): Impact of surgical and pathologic variables in rectal cancer: a United States community and cooperative group report. J Clin Oncol 19**:**3895-3902.

Surrallés J, Natarajan AT (1997): Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. Mutat Res 392:165-74.

Thomas P, Umegaki K, Fenech M (2003): Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. Mutagenesis 18**:**187-194.

Tsai MH, Hwang JS, Chen KC, Lin YP, Hsieh WA, Chang WP (2001): Dynamics of changes in micronucleus frequencies in subjects post cessation of chronic low-dose radiation exposure. Mutagenesis 16**:**251-255.

Tubiana M: Introduction to radiobiology; Taylor & Francis, London New York Philadelphia 1990.

UICC (International Union Against Cancer): TNM-Klassifikation maligner Tumoren, 6.Auflage; hrsg. Wittekind CH, Meyer HJ, Bootz F; Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo 2002.

Umegaki K, Fenech M (2000): Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. Mutagenesis 15**:**261-269.

Venkatachalam P, Paul SF, Mohankumar MN, Prabhu BK, Gajendiran N, Kathiresan A, Jeevanram RK (1999): Higher frequency of dicentrics and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. Mutat Res 425**:**1-8.

Widel M, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek-Zwierzycka K, Swierniak A (2003): Radiation-induced micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes is correlated with normal tissue damage in patients with cervical carcinoma undergoing radiotherapy. Radiat Res 159:713-21.

Wilkinson DS, Tlsty TD, Hanas RJ (1975): The inhibition of ribosomal RNA synthesis and maturation in Novikoff hepatoma cells by 5-fluorouridine. Cancer Res 35**:**3014-3020.

Wolff HA, Gaedcke J, Jung K, Hermann RM, Rothe H, Schirmer M, Liersch T, Herrmann MK, Hennies S, Rave-Fränk M et al. (2010): High-grade acute organ toxicity during preoperative radiochemotherapy as positive predictor for complete histopathologic tumor regression in multimodal treatment of locally advanced rectal cancer. Strahlenther Onkol 186**:**30-35.

Wolff HA, Conradi LC, Schirmer M, Beissbarth T, Sprenger T, Rave-Fränk M, Hennies S, Hess CF, Becker H, Christiansen H et al. (2011a): Gender-specific acute organ toxicity during intensified preoperative radiochemotherapy for rectal cancer. Oncologist 16:621-31.

Wolff HA, Hennies S, Herrmann MK, Rave-Fränk M, Eickelmann D, Virsik P, Jung K, Schirmer M, Ghadimi M, Hess CF et al. (2011b): Comparison of the micronucleus and chromosome aberration techniques for the documentation of cytogenetic damage in radiochemotherapy-treated patients with rectal cancer. Strahlenther Onkol 187:52-58.

Wolff HA, Wagner DM, Conradi LC, Hennies S, Ghadimi M, Hess CF, Christiansen H (2012): Irradiation with protons for the individualized treatment of patients with locally advanced rectal cancer: A planning study with clinical implications. Radiother Oncol 102:30-37.

Wolmark N, Wieand HS, Hyams DM, Colangelo L, Dimitrov NV, Romond EH, Wexler M, Prager D, Cruz AB, Jr., Gordon PH et al. (2000): Randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy with or without radiotherapy for carcinoma of the rectum: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol R-02. J Natl Cancer Inst 92**:**388-396.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. med. C. F. Hess danke ich für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in seiner Abteilung durchführen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Hendrik Wolff, der mir zu jeder Zeit mit großer Motivation, Professionalität und wertvoller Kritik hilfreich zur Seite stand.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H. Christiansen, der die Durchführung der vorliegenden Studie ermöglicht und unterstützt hat.

Weiterhin möchte ich Frau Dipl. Biol. M. Rave-Fränk danken, die mir während der gesamten Studie mit hilfreichen und weiterführenden Ratschlägen zur Seite stand und richtungweisend am erfolgreichen Abschluss der Arbeit beteiligt war.

Herrn Dr. Klaus Jung (AG Klinische Studien, Universitätsmedizin Göttingen) und Herrn Dr. Markus Schirmer (Abteilung Klinische Pharmakologie) möchte ich danken für die Beratung bei den statistischen Analysen.

Frau Alexandra Bitter, Frau Juliane Kasten-Krapp und Frau Sandra Hoffmeister danke ich für die stets freundliche und engagierte Hilfe im Labor.