

**Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
(Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. C.-F. Hess)
im Zentrum Radiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

Chromosomenaberrationsanalysen zur Bestimmung von DNA-
Schäden durch unterschiedliche Bestrahlungstechniken bei der
Strahlentherapie von Patienten mit Prostatakarzinomen

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

vorgelegt von
Nadine Thüne

aus
Leinefelde-Worbis

Göttingen 2013

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

I. Berichterstatterin: Prof. Dr. Renata Patricia Virsik-Köpp

II. Berichterstatterin: Prof. Dr. Andrea Hille

III. Berichterstatterin: Prof. Dr. Margarete Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2014

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung und Fragestellung</u>	5
<u>1.1. Das Prostatakarzinom</u>	5
<u>1.2. Einteilung nach Gleason-Score und TNM-Klassifikation</u>	6
<u>1.3. Therapiestrategien</u>	10
<u>1.4. Nebenwirkungen der Strahlentherapie</u>	15
<u>1.5. Chromosomenaberrationen</u>	20
<u>1.6. Fragestellung</u>	22
<u>2. Material und Methoden</u>	23
<u>2.1. Patientenkollektiv</u>	23
<u>2.2. Strahlentherapeutische Optionen</u>	28
<u>2.3. Lymphozytenkulturen</u>	28
<u>2.4. Metaphase-Präparate und FISH</u>	29
<u>2.5. Statistische Analyse</u>	32
<u>3. Ergebnisse</u>	34
<u>3.1. Chromosomenaberrationsraten in Patientenlymphozyten vor der Therapie sowie ein und zwei Jahre nach der Therapie</u>	34
<u>3.2. Chromosomale Austauschaberrationen vor Beginn der Therapie</u>	36
<u>3.3. Chromosomale Austauschaberrationen nach der Therapie</u>	38
<u>3.4. Multiple chromosomale Austauschaberrationen</u>	43
<u>3.5. Komplexe chromosomale Austauschaberrationen</u>	45
<u>3.6. Aneuploide Zellen</u>	47
<u>3.7. Einfluss des Alters auf die einfachen chromosomalen Austauschaberrationen in den Kontrollblutproben vor Beginn der Therapie</u>	49
<u>3.8. Tumorstaging und chromosomale Austauschaberrationsraten in Lymphozyten der Kontrollblutproben vor Beginn der Therapie</u>	51
<u>3.9. Einfluss von Belastungsfaktoren auf die einfachen chromosomalen Austauschaberrationen in den Kontrollblutproben vor Beginn der Therapie</u>	53
<u>3.10. Nebenwirkungen an Harnblase und Darm</u>	56
<u>4. Diskussion</u>	65
<u>5. Zusammenfassung</u>	75
<u>6. Anhang</u>	77
<u>6.1. Patienteninformation</u>	77

6.2. Patienteneinverständniserklärung..... 80

7. Literaturverzeichnis..... 81

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTC	Common Toxicity Criteria
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
d. h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAU	European Association of Urology
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FIX-Lösung	Fixierlösung
Gy	Gray
HDR	High-Dose-Rate
HIFU	High-Intensity Focused Ultrasound
HWZ	Halbwertszeit
IMRT	Intensity Modulated Radiation Therapy
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LDR	Low-Dose-Rate
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
PBD	Waschlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
PHA	Phytohämagglutinin

PSA	prostataspezifisches Antigen
RA	RapidArc
RPMI	Zellkulturmedium
RTOG/EORTC	Radiation Therapy Onkology Group/ European Organisation for Research and Treatment of Cancer
sog.	sogenannt
SSC	Saline-sodium citrate
UICC	Union for International Cancer Control
U/Min	Umdrehungen pro Minute
$Y_{S.E.}$	simple exchange rate
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist mit 25,7% aller Krebserkrankungen des Mannes die häufigste maligne Tumorerkrankung bei Männern in Deutschland. In der Krebsregisterdatei des Robert Koch-Institutes steht das Prostatakarzinom mit 10,5% an dritter Stelle der häufigsten durch Krebs bedingten Todesursachen des Mannes in Deutschland.

In den letzten 10 Jahren ist die Erkrankungsrate um 50% angestiegen. Dies ist durch die Möglichkeit der Früherkennung mittels des prostataspezifischen Antigens (PSA) zu erklären. Auf Grund dieser Methode des Screenings sinkt die Sterberate für das Prostatakarzinom seit 2003 kontinuierlich ab und die 5-Jahres-Überlebensrate ist auf 92% angestiegen.

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 70 Jahren. Männer im Alter unter 50 Jahren erkranken dagegen kaum am Prostatakarzinom (Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Ausgabe 2012).

Die Inzidenz des Prostatakarzinoms unterscheidet sich deutlich von der Sterberate. So traten im Jahr 2007 in den USA 240 890 Neuerkrankungen auf, allerdings starben im selben Jahr nur 33 720 der Erkrankten (American cancer society 2011).

Haas et al. kamen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass bei der Obduktion verstorbener Patienten, welche im Vorfeld nicht am Prostatakarzinom erkrankt waren, bei mehr als 60% der älteren Männer (Alter >80 Jahre) ein nicht diagnostiziertes Prostatakarzinom vorlag (Haas et al. 2008).

Anhand der aktuellen Datenbasis des Robert Koch-Institutes von 2008 haben Männer ein Lebenszeitrisiko von 13,0%, am Prostatakarzinom zu erkranken und ein Gesamtrisiko von 3,3% daran zu versterben (Krebs in Deutschland 2012).

Die Ursachen für die Entstehung des Prostatakarzinoms sind bis heute unklar. Es wird allerdings angenommen, dass das Alter einen wichtigen Risikofaktor darstellt, da mit steigendem Alter des Mannes das Erkrankungsrisiko zunimmt (Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Ausgabe 2012). Weiterhin ist bekannt, dass Männer mit einer positiven Familienanamnese für das Prostatakarzinom ein erhöhtes Erkrankungsrisiko haben (Johns und Houlston 2003).

95% der malignen Prostatatumore sind Adenokarzinome. Der übrige Anteil setzt sich zusammen aus selteneren Karzinomen wie z. B. dem Urothel- oder Plattenepithelkarzinom (European Association of Urology EAU 2012).

1.2. Einteilung nach Gleason-Score und TNM-Klassifikation

Ein wichtiger Prognosefaktor für das Adenokarzinom der Prostata ist der Gleason-Score, welcher das Differenzierungsmuster der Zellen im Karzinom beschreibt. Anhand des histologischen Bildes des Karzinoms werden 5 Grade der Zelldifferenzierung unterschieden (Humphrey 2004). Der Gleason-Score setzt sich schließlich aus dem am häufigsten im Tumor vorkommenden Gleason-Grad plus dem am schlechtesten differenzierten Gleason-Grad zusammen. Somit können Gleason-Scores zwischen 2 und 10 vorkommen (Epstein et al. 2005). Ein niedriger Gleason-Score lässt eine bessere Prognose vermuten.

Tabelle 1

Histologische Einteilung der Gleason-Grade (Epstein et al. 2005 S. 1231).

Gleason-Grad	Histologisches Bild
Grad 1	gut abgegrenzter Tumorknoten ohne Infiltration, dicht gepackte, uniforme Tumordrüsen mittlerer Größe
Grad 2	weitgehend abgegrenzter Tumorknoten mit kleinen Ausläufern, dicht gepackte, gering variable Tumordrüsen mittlerer Größe
Grad 3	3A: unscharfe Tumordinfiltrate, unregelmäßige Tumordrüsen 3B: wie 3A, aber kleine oder sehr kleine Drüsenschläuche 3C: kribriforme Strukturen
Grad 4	4A: fusionierte kleine, mittlere oder große Drüsen, unregelmäßig infiltrierend 4B: wie 4A, aber zahlreiche große Tumorzellen
Grad 5	5A: wie 3C, aber scharf begrenzte, runde Epithelhaufen mit meist solidem und kribriformem Bau, gewöhnlich mit zentralen Nekrosen 5B: unregelmäßig begrenzte Formationen eines undifferenzierten Karzinoms, das nur durch gerade noch erkennbare Drüsen- bildung oder Vakuolen als Adenokarzinom identifizierbar ist

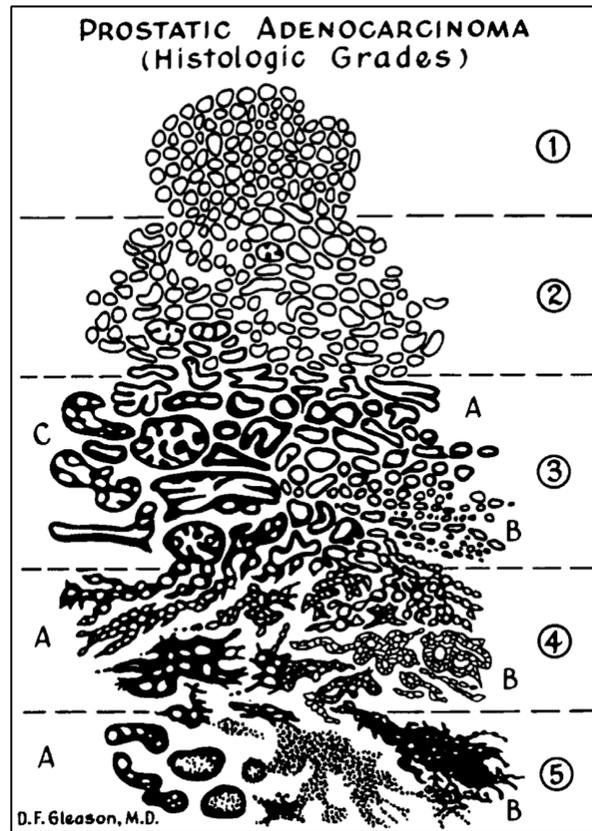


Abbildung 1

Darstellung der histologischen Gleason-Grade nach D. F. Gleason (Humphrey 2004 S. 293)

Die anatomische Klassifikation des Prostatakarzinoms erfolgt nach den TNM-Stadien der UICC (2009).

Tabelle 2

TNM-Klassifikation nach UICC (2009 S. 243-48)

Stage	Ausbreitung Primärtumor
T1	Tumor weder tastbar noch sichtbar
T1a	Histologischer Zufallsbefund in $\leq 5\%$ des resezierten Gewebes
T1b	Histologischer Zufallsbefund in $> 5\%$ des resezierten Gewebes
T1c	Befund durch Nadelbiopsie
T2	Tumor auf Prostata begrenzt
T2a	Tumor in \leq der Hälfte eines Lappens der Prostata
T2b	Tumor in $>$ der Hälfte eines Lappens der Prostata
T2c	Tumor in beiden Lappen der Prostata vorhanden
T3	Tumor hat die Organkapsel durchbrochen
T3a	Extrakapsuläre Ausbreitung
T3b	Infiltration der Samenblasen
T4	Tumor ist fixiert oder er infiltriert andere Nachbarstrukturen

Stage	Ausbreitung Metastasen
N0	Kein regionaler Lymphknoten befallen
N1	Regionaler Lymphknotenbefall
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden
M1a	Nichtregionaler Lymphknotenbefall
M1b	Knochenbefall
M1c	Andere Lokalisationen

1.3. Therapiestrategien

Zur prognostischen Einschätzung und Therapieentscheidung können die Patienten anhand von TNM-Stadium, Gleason-Score und PSA-Wert in 4 Risikogruppen eingeteilt werden (EAU-Guidelines on Prostate Cancer 2012).

Tabelle 3

Einteilung der Risikogruppen nach EAU-Guidelines on Prostate Cancer (2012 S.45-49)

Risikogruppe	Kriterien
Low-risk	T1a-T2a und Gleason ≤ 6 und PSA < 10 ng/ml (N0, M0)
Intermediate-risk	T2b-T2c oder Gleason 7 oder PSA 10-20ng/ml (N0, M0)
High-risk	T3a oder Gleason 8-10 oder PSA > 20 ng/ml (N0, M0)
Very high-risk	T3b-T4 und N0 oder $< T3b$ und N1 oder M1

Watchful waiting und Active surveillance

Unter *Watchful waiting* versteht man die verzögerte beziehungsweise die symptomorientierte Behandlung des Prostatakarzinoms bei Patienten mit einer Lebenserwartung < 10 Jahre und Tumor mit niedrigem Aggressivitätsgrad. Das *Watchful waiting* ist eine konservative Therapieoption. Der Patient wird erst bei symptomatischer Progression des Prostatakarzinoms palliativ behandelt. Der Grundgedanke dieses Therapieprinzips basiert auf der Tatsache, dass sich das Prostatakarzinom im hohen Alter langsam entwickelt (Adolfsson 2008). Nur bei lokal begrenzten Tumoren vom Stadium T1 bis T2 und N0, M0 sollte das *Watchful waiting* als Therapieoption in Betracht gezogen werden (Lu-Yao et al. 1997). Bei Prostatakarzinomen im Stadium T1 bis T2 und Gleason-Score ≤ 7 beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate 80-95% (Lu-Yao et al. 2009).

Beim *Active surveillance* steht der Patient aktiv unter Beobachtung. Der PSA-Wert wird regelmäßig bestimmt und der Patient digital-rektal untersucht. Erst wenn eine Progression des

Prostatakarzinoms sichtbar wird, erfolgt die Behandlung. Die Behandlungsziele dieser Therapiestrategie sind kurativ. Das Konzept des *Active surveillance* wurde entwickelt, um die Rate der übertherapierten Patienten der *low-risk*-Gruppe zu senken. Die Voraussetzung zur Anwendung des *Active surveillance* ist das Tumorstadium T1 bis T2, ein Gleason-Score ≤ 7 und ein PSA-Wert $< 15-20$ ng/ml (Adolfsson 2008).

Radikale Prostatektomie

Die radikale Prostatektomie ist das chirurgische Standardverfahren zur Entfernung der gesamten Prostata zusammen mit beiden Vesiculae seminalis (Bianco et al. 2005). Bei Patienten der *intermediate*- und *high-risk*-Gruppen werden oft zusätzlich die pelvinen Lymphknoten auf beiden Seiten entfernt (Briganti et al. 2012). Die radikale Prostatektomie wird vor allem bei Patienten mit *low-risk* und *intermediate-risk* mit lokal begrenztem Karzinom und einer Lebenserwartung > 10 Jahre empfohlen. Bei Patienten der *high-risk*-Gruppen ist eine radikale Prostatektomie optional möglich und muss in einem ausführlichen Gespräch zwischen Arzt und Patient erörtert werden (EAU Guidelines on Prostate Cancer 2012). Bei Männern mit einer Lebenserwartung ≥ 10 Jahren ist das Ziel der radikalen Prostatektomie, die Erkrankung vollständig zu heilen und dabei möglichst die Kontinenz und Potenz zu erhalten (Bianco et al. 2005).

Chirurgisch unterscheidet man die offene radikale Prostatektomie von der minimal-invasiven Methode. Im offenen Verfahren kann der Zugang retropubisch oder perineal erfolgen. Minimal-invasiv kann eine konventionell laparoskopische oder Roboter-assistierte laparoskopische radikale Prostatektomie durchgeführt werden. Hierbei bieten die minimal-invasiven Methoden den Vorteil, dass der intraoperative Blutverlust und die Transfusionsrate signifikant gesenkt werden (Ficarra et al. 2009).

Die Mortalitätsrate der Patienten mit radikaler Prostatektomie beträgt 0 bis 1,5% (EAU Guidelines on Prostate Cancer 2012). Ein großes Problem stellt die hohe Rate der postoperativen erektilen Dysfunktion dar. Mit Hilfe von nervenschonenden Operationstechniken kann das postoperative Risiko der erektilen Dysfunktion zwar gesenkt werden, es beträgt dennoch 30-40% (Bianco et al. 2005). Weitere Nebenwirkungen der radikalen Prostatektomie sind: Inkontinenz 4,0 bis 50,0%, Urin-Leakage-Fistel 0,3 bis 15,4%, große Blutungen 1,0 bis 11,5%, Strikturen der Urethra 2,0 bis 9,0% und rektale Verletzungen 0 bis 5,4% (EAU Guidelines on Prostate Cancer 2012).

Hormontherapie

Die Tumorzellen des Prostatakarzinoms wachsen zuerst testosteronabhängig. Auf Grund dessen wird versucht, eine Hormonblockade entweder chirurgisch durch Orchiektomie oder eine medikamentöse Kastration herbeizuführen. Zur medikamentösen Kastration kann einerseits eine Androgendeprivationstherapie durch die Gabe von LHRH-Agonisten durchgeführt werden, welche die Testosteronbildung im Hoden hemmen. Andererseits kann mit Hilfe der Antiandrogentherapie die Testosteronaufnahme und Wirkung an der Prostatazelle blockiert werden. In diesem Fall konkurrieren die Antiandrogene mit dem Testosteron um die Rezeptoren an der Tumorzelle der Prostata. Sie lösen die Apoptose der Tumorzellen aus und hemmen somit das Wachstum des Prostatakarzinoms. Kombiniert man beide Prinzipien der Hormontherapie, wird eine komplette Androgenblockade durchgeführt. Die hormonelle Kastration wird palliativ beim Prostatakarzinom mit Fernmetastasen und Lymphknotenbefall sowie kurativ bei lokal begrenztem Karzinom in Kombinationstherapie mit der radikalen Prostatektomie oder Radiotherapie eingesetzt (EAU Guidelines on Prostate Cancer 2012).

Perkutane Strahlentherapie und Brachytherapie

Die Strahlentherapie wird unterteilt in perkutane Therapie und Brachytherapie. Bei der perkutanen Therapie wird der Körper von außen mit ionisierender Strahlung bestrahlt, während bei der Brachytherapie die Strahlenquelle im Körper platziert wird. Brachytherapie wird nur bei einem Prostatavolumen <60 ml durchgeführt. In der Strahlentherapie des Prostatakarzinoms werden mehrere Bestrahlungstechniken und ihre Kombinationen verwendet.

1. perkutane Radiotherapie (3D-Konformationstherapie, intensitätsmodulierte Radiotherapie: IMRT und RapidArc-Radiotherapie)
2. Brachytherapie mit niedriger Dosisrate (*low-dose-rate*, LDR-Technik) in Form permanenter Implantate unter Verwendung von Jod-125 oder Palladium-103
3. Brachytherapie mit hoher Dosisrate (*high-dose-rate*, HDR-Technik) in Form temporärer Implantate unter Verwendung von Iridium-192; diese Technik wird angewendet in Kombination mit perkutaner Therapie: HDR + IMRT oder HDR + RapidArc oder HDR + 3D- (Mehrfeld-) Konformationstherapie

Die Auswahl des Bestrahlungsverfahrens wird für jeden Patienten individuell entschieden und erfolgt anhand der Zuordnung zu einer Risikogruppe sowie der Prostatagröße. Die Patienten der *low-risk*-Gruppe werden je nach der Prostatagröße mit perkutaner Strahlentherapie oder LDR-Brachytherapie behandelt, während die Patienten der intermediär- und *high-risk*-Gruppen mit perkutaner Radiotherapie plus HDR-Brachytherapie behandelt werden.

Zu den perkutanen Bestrahlungsmöglichkeiten gehören die 3D-Konformationsradiotherapie, IMRT und RapidArc-Bestrahlung. Bei diesen Techniken wird im Vorfeld eine Planungscomputertomographie zur Erfassung der Tumormasse und Schonung des umliegenden Gewebes durchgeführt.

Die Konformationsradiotherapie ist eine Mehrfeldertechnik, bei welcher das Prostatakarzinom über 4 kreuzförmig angeordnete Bestrahlungsfelder bestrahlt wird. Somit entsteht die Maximaldosis im Bereich der Prostata, indem sich alle 4 Felder überlappen (Karstens et al. 2010).

Hinter der Bezeichnung IMRT verbirgt sich die intensitätsmodulierte Radiotherapie. Bei dieser Technik wird versucht, die umliegenden strahlensensitiven Risikoorgane wie Harnblase und Rektum besser zu schonen. Dazu werden die Bestrahlungsfelder in bis zu 15 Segmente aufgeteilt. Zusätzlich kann die Strahlendosis innerhalb der Segmentfläche durch Zwischenschaltung sog. Modulatoren zwischen Patient und Strahlenquelle moduliert werden (Karstens et al. 2010).

Der Begriff RapidArc-Bestrahlung bezeichnet ein neues Verfahren der perkutanen Radiotherapie. Bei diesem wird eine intensitätsmodulierte Bestrahlung (IMRT) mit einem um den Patienten rotierenden Therapiegerät durchgeführt. Dies ermöglicht eine bessere Schonung des umliegenden Normalgewebes bei gleichzeitig höherer Strahlendosis im Prostatakarzinom-Zielvolumen. (<http://www.strahlentherapie.med.uni-goettingen.de/html/technik/rapidarc.html>).

Bei der Brachytherapie ist die Strahlenquelle direkt im Tumor oder in Tumornähe lokalisiert. Dadurch kann eine hohe Strahlendosis im Tumor erreicht werden. Die Brachytherapie wird allein (bei *low-risk*-Prostatakarzinom) oder in Kombination mit perkutaner Radiotherapie (bei *intermediate*- und *high-risk*-Prostatakarzinom) eingesetzt. Zu den Verfahren in der Brachytherapie gehören die *Low-Dose-Rate*-Brachytherapie (LDR) und die *High-Dose-Rate*-Brachytherapie (HDR).

Bei der LDR werden mehrere radioaktive Implantate, sog. *Seeds*, über eine dünne Hohlnadel unter sonografischer Kontrolle an vorher geplante Stellen im Prostatakarzinom platziert. Als Seeds werden Jod-125 oder Palladium-103 mit Halbwertszeiten von 59,4 Tagen bzw. 17 Tagen verwendet. Die applizierte Zielvolumendosis beträgt 144 Gy bzw. 124 Gy. Die Implantate verbleiben dauerhaft in der Prostata (Karstens et al. 2010).

Die HDR ist dagegen ein Verfahren, bei dem erst nicht-strahlende Applikatoren im Prostatakarzinom platziert werden. Mit Hilfe eines Führungsschlauches wird dann die Strahlenquelle aus einem Strahlenschutzbehälter in die Prostata motorisch gesteuert transportiert. Dies wird als *Afterloading* bezeichnet. Als Strahlenquelle wird Iridium-192 verwendet, das nach Erreichen von einer 10 bis 12 Gy Zielvolumen-Dosis anschließend motorisch gesteuert wieder entfernt wird. Eine gesamt fraktioniert verabreichte HDR-Dosis von 30 Gy wird in Kombination mit externer Bestrahlung mit etwa 40 bis 50 Gy kombiniert (Karstens et al. 2010).

Experimentelle Verfahren

Neben den konventionellen Therapieverfahren kann das Prostatakarzinom experimentell mittels Kryotherapie oder HIFU (*high-intensity focused ultrasound*) behandelt werden.

Bei der Kryotherapie werden unter transrektaler Ultraschallkontrolle sog. Kryonadeln in der Prostata platziert. Durch die Kryonadeln wird die Prostata zweimal bei -40°C tiefgefroren und die Tumorzellen somit abgetötet.

Die HIFU-Therapie wirkt genau gegenteilig. Durch transrektalen Ultraschall wird die Prostata punktgenau auf $>65^{\circ}\text{C}$ erhitzt und somit die Tumorzellen zerstört (EAU Guidelines on Prostate Cancer 2012).

1.4. Nebenwirkungen der Strahlentherapie

Die Strahlentherapie hat in der Behandlung des Prostatakarzinoms einen hohen Stellenwert eingenommen. Dennoch leiden viele Patienten unter den unerwünschten Nebenwirkungen der Strahlentherapie. Die Ausprägung der Nebenwirkungen ist allerdings bei jedem Patienten individuell unterschiedlich.

Die unerwünschten Nebenwirkungen der Strahlentherapie bei Patienten mit Prostatakarzinom werden eingeteilt in akute und späte Nebenwirkungen. Als akute Nebenwirkungen bezeichnet man die Nebenwirkungen im Zeitraum während der Therapie bis einschließlich 90 Tage nach Bestrahlungsende. Die späten Nebenwirkungen treten >90 Tage nach Therapieende auf (Zelefsky et al. 2008).

Anhand der *Common Toxicity Criteria* (CTC) können die Nebenwirkungen in 5 Grade eingeteilt werden. Hierbei beschreibt Grad 0 keine Nebenwirkungen und Grad 4 entspricht schweren Nebenwirkungen, teilweise mit Todesfolge (CTC 2.0, 1999). Aktuell ist bereits eine überarbeitete 4.0-Version der *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE) von 2009 vorhanden. In dieser Dissertation werden allerdings Nebenwirkungen ausgewertet, deren Einteilung noch anhand der CTC 2.0 erfolgte, weil diese Studie vor dem Jahr 2009 begonnen wurde.

Als Nebenwirkungen der Strahlentherapie des Prostatakarzinoms sind vor allem die Proktitis und die Zystitis zu nennen. Die Proktitis ist gekennzeichnet durch Blutung und Schmerzen beim Stuhlgang sowie vermehrten Stuhldrang. Bei der Zystitis treten vor allem Dysurie, Pollakisurie, krampfartige Schmerzen der Harnblase sowie Hämaturie auf.

Tabelle 4

Einteilung der Akutnebenwirkungen der Harnblase nach den *Common Toxicity Criteria* (CTC) Version 2.0 (Trotti et al. 2000)

Nebenwirkung	Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
Blasenkrämpfe	keine Symptome	leichte Blasenkrämpfe, nicht behandlungsbedürftig	Symptome, die eine spasmolytische Medikation erfordern	schwere Symptome, die eine Gabe von Betäubungsmitteln erfordern	-
Dysurie	keine Symptome	leichte Symptome, nicht behandlungsbedürftig	Symptome, die durch Therapie gelindert werden können	Symptome, die trotz Therapie nicht gelindert werden können	-
Pollakisurie	kein vermehrter Harndrang	leicht vermehrter Harndrang oder Nykturie ≤ 2 x der Normalfrequenz	mäßig vermehrter Harndrang mit Frequenz >2 x der Normalfrequenz aber <1 /Stunde	stark vermehrter Harndrang mit Frequenz mehr als 1 x/Stunde oder Katheterisierung erforderlich	-
Hämaturie	keine Blutung	mikroskopisch nachweisbar	intermittierende makroskopisch sichtbare Blutung ohne Gerinnsel	persistierende makroskopisch sichtbare Blutung oder Gerinnsel, die eventuell eine Katheterisierung oder Bluttransfusion erfordern	Nekrosen oder blutende, tiefe Ulcerationen, die eventuell einen chirurgischen Eingriff erfordern

Tabelle 5

Einteilung der Spätnebenwirkungen der Harnblase nach den Kriterien der RTOG-EORTC
(Cox et al. 1995)

Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
keine Symptome	leichte epitheliale Atrophie, geringe Teleangiectasien, Mikrohämaturie	mäßige Pollakisurie, generalisierte Teleangiectasien, intermittierende Makrohämaturie	schwere Pollakisurie und Dysurie, generalisierte Teleangiectasien, häufig mit Petechienbildung, häufig Makrohämaturie, Reduktion der Blasenkapazität <150 ml	Nekrosen, Blasenkontrakturen mit Reduktion der Kapazität <100 ml, schwere hämorrhagische Zystitis

Tabelle 6Einteilung der Akutnebenwirkungen am Enddarm nach den *Common Toxicity Criteria* (CTC)

Version 2.0 (Trotti et al. 2000)

Nebenwirkung	Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
Proktitis	keine Symptome	erhöhte Stuhlfrequenz, gelegentlich Blutauflagerung im Stuhl oder rektale Beschwerden (einschließlich Hämorrhoiden), keine Medikation erforderlich	erhöhte Stuhlfrequenz, rektale Blutung, Schleimabsonderung, rektale Beschwerden, Analfissuren, Medikation erforderlich	erhöhte Stuhlfrequenz/Diarrhoe, parenterale Substitution erforderlich, starke rektale Blutung, die eine Bluttransfusion erfordert oder persistierende Schleimabsonderung mit Vorlagennutzung	Perforation, Blutung, Nekrose oder andere lebensbedrohliche Komplikationen, die einen chirurgischen Eingriff erfordern (z.B. Anlage Kolostoma)

Tabelle 7

Einteilung der Spätnebenwirkungen am Enddarm nach den Kriterien der RTOG-EORTC (Cox et al. 1995)

Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
keine Symptome	leichte Diarrhoe, leichte Bauchkrämpfe, Stuhlabgang: fünfmal täglich, geringe rektale Absonderung oder Blutung	mäßige Diarrhoe und Kolik, Stuhlabgang: >fünfmal täglich, übermäßiger rektaler Schleimabgang oder intermittierende Blutung	Obstruktion oder Blutung, die einen chirurgischen Eingriff erfordern	Nekrosen, Perforationen, Fisteln

Auf Grund der individuell unterschiedlich ausgeprägten Nebenwirkungen wäre es hilfreich, Korrelationen oder Testverfahren zu finden, die im Idealfall eine schnelle und individuelle Patiententestung vor Beginn der Therapie ermöglichen würden, um Nebenwirkungen zu vermeiden. Die Vorhersage der individuellen Strahlensensitivität vor Beginn der Radiotherapie könnte so z. B. bei Patienten mit hoher Strahlensensitivität zur Verminderung der Gesamtdosis führen, um die unerwünschten Nebenwirkungen zu reduzieren.

Zur Untersuchung der Strahlenwirkung auf den menschlichen Körper eignen sich u.a. die Lymphozyten aus dem peripheren Blut. Zu den wichtigsten zellulären Wirkungen der ionisierenden Strahlung gehört die Induktion von strahleninduzierten Chromosomenaberrationen, die aus fehlerreparierten strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen resultieren. Die Chromosomenaberrationen können mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mikroskopisch detektiert und analysiert werden.

Brzowska et al. analysierten in ihrer Studie die individuelle Radiosensitivität von Patienten mit Prostatakarzinom mit und ohne Nebenwirkungen nach einer Strahlentherapie. Dazu haben sie Lymphozyten von diesen Patienten *in vitro* in der G2-Phase bestrahlt. Im Vergleich dazu untersuchten sie *in vitro* bestrahlte Lymphozyten von gesunden Probanden. In den Lymphozyten von Patienten mit Prostatakarzinom traten mehr Chromatidaberrationen auf als in den *in vitro* bestrahlten Lymphozyten der gesunden Probanden. Es zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den Chromatidaberrationsraten in Patienten mit und ohne Strahlentherapie-Nebenwirkungen (Brzowska et al. 2012). Die mögliche Testung mit dem sogenannten G2-Assay scheidet also aus.

Henríquez-Hernández et al. beschäftigten sich mit dem Vergleich von Studien, die sich mit der Möglichkeit der Vorhersage von strahleninduzierter Toxizität im Normalgewebe befassten. Alle bisherigen Studien sprechen dafür, dass strahleninduzierte DNA-Schäden in Lymphozyten des peripheren Blutes zur Prädiktion der strahleninduzierten Toxizität im Normalgewebe geeignet sind. Dabei erscheint aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse die Menge der initialen DNA-Schäden für die Toxizitätsprädiktion leider nicht sehr zuverlässig. Bei der strahleninduzierten Apoptose scheint das Verhältnis umgekehrt zu sein: je höher die Apoptoserate in den Lymphozyten des Patienten ist, desto geringer ist die später auftretende Toxizität. Die ersten Studien zur Rolle der individuellen Expression sind vielversprechend. Bisher ist aber kein prädiktiver Test zur Vorhersage strahleninduzierter Toxizität genügend validiert und generell anerkannt (Henríquez-Hernández et al. 2012).

1.5. Chromosomenaberrationen

Die ionisierende Strahlung induziert Schäden in allen Zellen und ihren Bestandteilen. Die Schädigungen der DNA sind besonders toxisch, weil sie unrepariert zum Zelltod oder zu Mutationen führen können und weil sie falsch repariert, ebenfalls den Zelltod, Mutationen und Chromosomenaberrationen hervorrufen können. Nicht-letale Änderungen können zu maligner Zelltransformation führen. Besonders schwerwiegend sind die strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüche, da in der DNA die Informationen für alle Moleküle des Körpers verschlüsselt sind. Die Reparaturmechanismen der Zelle sind dabei vielfältig. Da an der

Reparatur mehrere Mechanismen beteiligt sind, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden, können die Reparaturmechanismen der Patienten individuell unterschiedlich sein. Bei Patienten, die genetisch bedingt defekte Reparaturmechanismen haben, können mehr Fehlreparaturen entstehen und dies könnte mit stärkeren Nebenwirkungen während und nach der Strahlentherapie verbunden sein.

Seit circa 20 Jahren befasst sich die Forschung in diversen Studien mit den Reparaturmechanismen von Fehlern und Schäden im chromosomalen Material der eukaryotischen Zellen. Dabei stellen die DNA-Doppelstrangbrüche die gravierendsten Fehler im chromosomalen Material dar. Aktuell sind mindestens 10 effiziente Mechanismen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen bekannt. (z. B. Karahalil et al. 2012; Malkova und Haber 2012; Parsons und Dianov 2013; Kavanagh et al. 2013; Yang et al. 2013; Jensen et al. 2013; Yasui 2013; Edelbrock et al. 2013; Wang et al. 2013)

Zu den einfachen Chromosomen-Austauschaberrationen gehören die einfachen Translokationen und die dizentrischen Chromosomen. Bei der einfachen Translokation kommt es zum Austausch von chromosomalen Material zwischen zwei Chromosomen in einer Zelle. Bei dizentrischen Chromosomen kommt es zu einer Fusion von zwei Chromosomen, die vorher jeweils ein abgebrochenes Chromosomenfragment verloren haben. Die von beiden beteiligten Chromosomen abgebrochenen Fragmente fusionieren in ca. 90% zusammen. Dieses abgebrochene, chromosomale Material liegt dann frei als azentrisches Fragment im Zellkern.

Der Begriff *multiple chromosomale Austauschaberration* bezieht sich auf das Vorhandensein von mehreren einzelnen Austauschaberrationen in einer einzelnen Zelle. Eine komplexe chromosomale Austauschaberration liegt vor, wenn in einer Zelle ein Austausch von chromosomalem Material stattgefunden hat, an dem mindestens zwei Chromosomen und drei Brüche beteiligt sind.

Eine Aneuploidie liegt vor, wenn in einer Zelle eine numerische Abweichung vom euploiden (diploiden) Chromosomensatz vorkommt. Der euploide Chromosomensatz des Menschen besteht aus 22 autosomalen Chromosomenpaaren und entweder zwei X-Chromosomen oder einem X- und einem Y-Chromosom, also aus 46 Einzelchromosomen. Zu den aneuploiden Veränderungen gehören z.B. die Trisomie, bei der ein Chromosom in dreifacher Ausführung vorliegt oder die Monosomie, bei der nur ein Chromosom des entsprechenden Chromosomenpaares vorhanden ist. (Buselmaier und Tariverdian 2007)

1.6. Fragestellung

In dieser Arbeit sollen Strahlenwirkungen auf Lymphozyten von Patienten mit Prostatakarzinom nach Strahlentherapie mit verschiedenen Techniken untersucht und verglichen werden. Als Maß für die Strahlenwirkung sollen die einfachen chromosomalen Austauschaberrationsraten mit Hilfe der 3-Farben-FISH Methode untersucht werden. Retrospektiv soll dann eine mögliche Korrelation zwischen diesen Aberrationsraten und den beobachteten Nebenwirkungen der unterschiedlichen Strahlentherapie-Modalitäten untersucht werden. Hierzu sollen strahleninduzierte Chromosomenaberrationen in Lymphozyten von unterschiedlich therapierten Patienten mit einem Prostatakarzinom bis maximal T3-, N0- und M0-Stadium untersucht werden. Die Lymphozyten des peripheren Bluts dieser Patienten sollen zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Strahlentherapie mikroskopisch untersucht werden, um die Chromosomenaberrationsraten zu bestimmen und zu vergleichen. Bei diesem Vergleich sollen zusätzlich zu den verschiedenen Therapieoptionen auch die anamnestischen Belastungsfaktoren in die Bewertung einbezogen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Im Zeitraum von Januar 2009 bis Dezember 2011 wurden 62 Patienten mit primärem Prostatakarzinom im Alter von 51 bis 84 Jahren in die Studie aufgenommen. Das Medianalter beträgt 72 Jahre. Es wurde darauf geachtet, dass das Tumorstadium der Probanden nach TNM-Klassifikation maximal T3, N0 und M0 betrug.

Die Teilnahme der Patienten an der durch die Ethikkommission der Universität Göttingen bewilligten Studie erfolgte freiwillig. Im Vorfeld wurden die Probanden ausführlich über den Inhalt der Studie aufgeklärt und unterschrieben eine Einwilligungserklärung.

Die Patienten erschienen zu maximal 3 Blutentnahmetermenen. Zusätzlich wurden Daten über den Raucherstatus, die Familienanamnese und den aktuellen oder ehemaligen Beruf des Probanden erhoben. Des Weiteren konnten Informationen über die akuten und späten Nebenwirkungen aus der jeweiligen Patientenakte entnommen werden.

Die Patienten wurden kodiert mit **PA 1** bis **PA 62**. Die gewonnenen Blutproben wurden den kodierten Patientennummern wie folgt zugeordnet: **.0** für die Kontrollabnahme vor Beginn der Strahlentherapie, **.1** für die Blutentnahme 8 bis 18 Monate nach Beendigung der Bestrahlung, **.2** für die Abnahme 19 bis 28 Monate nach Beendigung der Bestrahlung.

Anhand der durchgeführten Strahlentherapie wurden die Probanden in die Gruppe 1: HDR, Gruppe 2: RapidArc, Gruppe 3: IMRT und Gruppe 4: andere Bestrahlungsregime (LDR, 4-Felder-Bestrahlung, 5-Felder-Bestrahlung) eingeteilt. Die Gruppe HDR wurde genauer unterteilt in HDR + IMRT, HDR + RapidArc, HDR + 4-Felder und HDR + 5-Felder.

Das Patientenkollektiv ist in den Tabellen 8-11 aufgelistet.

Tabelle 8

Bestrahlungsregime und Alter der Patienten des Patientenkollektivs Gruppe 1: HDR

Patienten- nummer	Bestrahlungs- regime*	Alter in Jahren**
PA 1	1a	70
PA 2	1a	71
PA 7	1a	76
PA 13	1a	69
PA 38	1a	60
PA 5	1b	71
PA 6	1b	57
PA 8	1b	73
PA 9	1b	73
PA 11	1b	64
PA 14	1b	56
PA 15	1b	73
PA 16	1b	62
PA 18	1b	69
PA 21	1b	72
PA 22	1b	71
PA 31	1b	72
PA 32	1b	75
PA 33	1b	69
PA 39	1b	68
PA 42	1b	73
PA 46	1b	70
PA 48	1b	74

* 1a: HDR + IMRT; 1b: HDR + RA; 1c: HDR + 4-Felder; 1d: HDR + 5-Felder; 2: RA; 3: IMRT; 4: LDR;
5: 4-Felder; 6: 5-Felder

** Alter zum Zeitpunkt der Manifestation der Erkrankung, d. h. das Alter vor Beginn der Bestrahlung.

Fortsetzung Tabelle 8

Patienten- nummer	Bestrahlungs- regime*	Alter in Jahren**
PA 52	1b	72
PA 54	1b	70
PA 55	1b	71
PA 58	1b	75
PA 61	1b	77
PA 24	1c	72
PA 35	1c	67
PA 40	1c	75
PA 50	1c	65
PA 51	1c	62
PA 4	1d	74
PA 57	1d	75

Tabelle 9

Bestrahlungsregime und Alter der Patienten des Patientenkollektivs Gruppe 2: RapidArc

Patienten- nummer	Bestrahlungs- regime*	Alter in Jahren**
PA 3	2	69
PA 10	2	65
PA 17	2	77
PA 19	2	73
PA 23	2	78
PA 27	2	71

* 1a: HDR + IMRT; 1b: HDR + RA; 1c: HDR + 4-Felder; 1d: HDR + 5-Felder; 2: RA; 3: IMRT; 4: LDR;
5: 4-Felder; 6: 5-Felder

** Alter zum Zeitpunkt der Manifestation der Erkrankung, d.h. das Alter vor Beginn der Bestrahlung.

Fortsetzung Tabelle 9

Patienten- nummer	Bestrahlungs- regime*	Alter in Jahren**
PA 29	2	62
PA 30	2	84
PA 37	2	77
PA 41	2	74
PA 43	2	77
PA 44	2	70
PA 47	2	75
PA 49	2	72
PA 53	2	72
PA 56	2	72
PA 59	2	72
PA 60	2	67
PA 62	2	70

Tabelle 10

Bestrahlungsregime und Alter der Patienten des Patientenkollektivs Gruppe 3: IMRT

Patienten- nummer	Bestrahlungs- regime*	Alter in Jahren**
PA 20	3	73
RA 34	3	76
RA 36	3	72

* 1a: HDR + IMRT; 1b: HDR + RA; 1c: HDR + 4-Felder; 1d: HDR + 5-Felder; 2: RA; 3: IMRT; 4: LDR;
5: 4-Felder; 6: 5-Felder

** Alter zum Zeitpunkt der Manifestation der Erkrankung, d. h. das Alter vor Beginn der Bestrahlung.

Tabelle 11

Bestrahlungsregime und Alter der Patienten des Patientenkollektivs Gruppe 4: andere Bestrahlungsregime

Patienten- nummer	Bestrahlungs- regime*	Alter in Jahren**
PA 12	4	51
PA 28	4	73
PA 45	5	68
PA 26	6	67

Bei Patient PA 25, der zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme vor der Therapie 69 Jahre alt war, erfolgte keine Radiotherapie.

* 1a: HDR + IMRT; 1b: HDR + RA; 1c: HDR + 4-Felder; 1d: HDR + 5-Felder; 2: RA; 3: IMRT; 4: LDR;
5: 4-Felder; 6: 5-Felder

** Alter zum Zeitpunkt der Manifestation der Erkrankung, d. h. das Alter vor Beginn der Bestrahlung.

2.2. Strahlentherapeutische Optionen

Wie bereits in 2.1. erwähnt, wurden die Probanden mit unterschiedlichen Verfahren bestrahlt. Der größte Teil des Patientenkollektives wurde mit RapidArc- oder HDR-Bestrahlung therapiert. Da zum Zeitpunkt der Durchführung der Studie weniger Patienten mittels IMRT bestrahlt wurden, ist diese Gruppe entsprechend klein ausgefallen. Auch die Anzahl der Patienten in der Gruppe mit den anderen Bestrahlungsregimen ist gering.

In Tabelle 12 sind die unterschiedlichen Bestrahlungsgruppen mit der Gesamtdosis und der Dosisrate der Strahlentherapie angegeben.

Tabelle 12

Bestrahlungsregime und die entsprechende Gesamtdosis und Dosisrate.

Bestrahlungsregime	Gesamtdosis Gy	Dosisrate Gy/min
Gruppe RapidArc	61,0-72,0	2,15-4,78
Gruppe HDR	68,0-86,0	0,87-3,93
Gruppe IMRT	71,0-72,0	1,03-1,8

2.3. Lymphozytenkulturen

Pro Patient wurden 15 ml heparinisiertes Vollblut (2x 7,5 ml Heparin-Monovette von Sarstedt) mittels Venenpunktion entnommen. Die erste Blutentnahme erfolgte vor Beginn der Strahlentherapie. Die zweite Blutprobe wurde jeweils 8 bis 18 Monate später nach Beendigung der Therapie gewonnen. Bei einigen Patienten war es möglich, eine dritte Blutentnahme nach insgesamt 19 bis 28 Monaten durchzuführen. Es wurde jedoch beachtet, dass der Zeitabstand zwischen der zweiten und der dritten Blutprobe mindestens 3 Monate oder länger betrug.

Das Patientenblut wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert und innerhalb von 2 Tagen nach der Abnahme verarbeitet.

Das im Kühlschrank gelagerte Blut wurde an einer sterilen Werkbank (Heraeus) aufgearbeitet. Dabei wurden je 5 ml Blut und 45 ml Kulturmedium mittels einer sterilen Einmalpipette (Greiner bio-one) in je 2 Zellkulturflaschen (Greiner bio-one) umgefüllt. Anschließend wurde zur Stimulation der Lymphozytenproliferation in beide Zellkulturflaschen jeweils 500 µl Phytohämagglutinin (PHA von Biochrom-AG) aus dem Kühlschrank dazugegeben. Die Lymphozytenkulturen wurden nun für 48 Stunden im Wärmeschrank (Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Das Kulturmedium setzte sich zusammen aus einer Packung RPMI 1640 (Biochrom), welches mit 5 l Aqua bidest aufgefüllt wurde. Zusätzlich wurde 10% fetales Kälberserum (Biochrom) zum Kulturmedium hinzugegeben, welches vorher bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert wurde.

2.4. Metaphase-Präparate und FISH

Herstellung von Metaphase-Präparaten

Nach 46 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden in die Zellkulturflaschen jeweils 1000 µl Colcemid (Gibco) gegeben und die Proben anschließend für weitere 2 Stunden inkubiert. Das Colcemid diente dabei als Spindelgift, um die in die Mitose eingetretenen Zellen in der Metaphase anzuhalten und anzureichern.

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 48 Stunden wurden je 10 ml der Lymphozytenkultur in jeweils 10 beschriftete Zentrifugenröhrchen (Greiner bio-one) umgefüllt und 10 Minuten mit 1200 U/min bei 24°C zentrifugiert (Heraeus). Der entstandene Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Anschließend erfolgte unter ständigem Vortexen tröpfchenweise die Zugabe von jeweils 7 ml KCl-Lösung pro Röhrchen, welche vorher im Wasserbad (Heraeus) bei 37°C erwärmt wurde.

Die osmotisch wirksame KCl-Lösung wurde aus 2,8 g KCl (Merck) und 500 ml Aqua bidest hergestellt. Die entstandene Zellsuspension wurde nun für 20 Minuten im Wärmeschrank (Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension erneut 10 Minuten mit 1200 U/min bei 24°C zentrifugiert (Heraeus). Der entstandenen Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Unter erneutem Vortexen erfolgte tröpfchenweise die Zugabe von jeweils 7 ml FIX-Lösung pro Röhrchen. Anschließend wurde

die Zellsuspension wieder 10 Minuten mit 1200 U/min bei 24°C zentrifugiert. Die FIX-Lösung wurde aus Eisessig (Merck) und Methanol (Merck) im Verhältnis 1:3 erzeugt und diente dem Waschen und Fixieren der Zellen. Der Vorgang des Zentrifugierens, der Abnahme des Überstandes und der Resuspendierung mit FIX-Lösung erfolgte 2 bis 3 mal nacheinander, bis die Proben ausreichend gewaschen waren und als helles Pellet erschienen. Zum Schluss wurden die Zellen aller Zentrifugenröhrchen mit Hilfe einer Transferpipette (Sarstedt) in ein Röhrchen vereinigt, mit FIX-Lösung aufgefüllt, mit einem Stopfen verschlossen und im Kühlschrank (Siemens) bei 3°C gelagert.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) der Metaphase-Präparate

Zur Herstellung der FISH-Präparate wurde das Zellpellet mit Hilfe einer Transferpipette (Sarstedt) resuspendiert und 20 µl der Metaphase-Zellsuspension auf einen mit Aqua bidest angefeuchteten Objektträger (Knittel Gläser) mittig aufgetropft. Das an den Rand verdrängte Wasser, wurde mit Zellstoff aufgesaugt. Durch eine mikroskopische Kontrolle wurde sichergestellt, dass sich eine ausreichende Anzahl von Metaphase-Chromosomen auf dem Objektträger befand. Anschließend wurde der Objektträger über Nacht luftgetrocknet.

Am zweiten Tag wurde der Objektträger für 30 Minuten in einer Küvette mit Pre-wash-Puffer im Wasserbad (Heraeus) bei 37°C gewaschen. Der Pre-wash-Puffer wurde aus 2-fach SSC (Biochrom) und 0,5 prozentigem Igepal (Biochrom) bei Einhaltung des pH-Werts 7,0 hergestellt. Anschließend wurde der Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 95% EtOH) (Biochrom) für jeweils 2 Minuten denaturiert und danach für 10 Minuten luftgetrocknet.

Im Anschluss wurden im abgedunkelten Zimmer 10 µl des Farbgemisches auf den Objektträger mit Hilfe einer Pipette (Eppendorf) aufgetragen. Das Farbgemisch setzte sich zusammen aus 3 µl der grünen Farbsonde für Chromosom 1 (Meta Systems GmbH), 3 µl der roten Sonde für Chromosom 2 (Meta Systems GmbH) und jeweils 2 µl grüner und 1 µl roter Sonde für Chromosom 4 (Meta Systems GmbH). Die Sondenmischung für das Chromosom 4 ergab eine gelbe Färbung.

Die mit dem Farbgemisch bedeckte Stelle des Objektträgers wurde mit einem 22 x 22 mm großen Deckglas (Menzel- Gläser) abgedeckt und mit Fixogum (Marabu) abgedichtet. Nach Erhitzen des Objektträgers auf einer Heizplatte (Medax) bei 75°C für 5 Minuten erfolgte die

Inkubation in einer feuchten Kammer im Wärmeschrank (Heraeus) bei 37°C ohne CO₂ für 24 Stunden.

Am dritten Tag wurde zuerst das Deckglas mit dem Fixogum vom Objektträger entfernt und dieser anschließend in einer Küvette mit 0,5-fach SSC (Biochrom) bei pH 7,0 für 5 Minuten im Wasserbad (VWR) bei 65°C gewaschen. Nach kurzem Abkühlen wurde der Objektträger in einer Küvette mit 1-fach PBD (Biochrom) für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden 10 µl DAPI (Meta Systems GmbH) auf den nassen Objektträger pipettiert und dieser mit einem Deckglas 24 x 32 mm (Menzel-Gläser) abgedeckt. Als letztes wurden alle 4 Kanten des Deckglases mit farblosem Nagellack (Basic) versiegelt und die Objektträger im Gefrierschrank bei -20°C (Siemens) für maximal 2 Wochen bis zur mikroskopischen Auswertung gelagert.

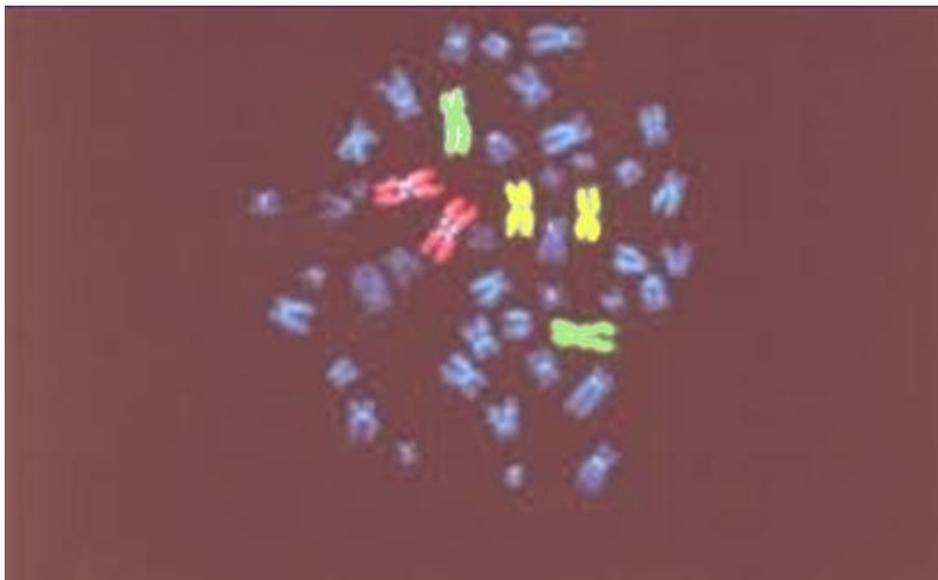


Abbildung 2

Eine normale Metaphase-Zelle mit hybridisierten Chromosomen 1 (rot), 2 (grün) und 4 (gelb). Die anderen Chromosomen sind mit DAPI (blau) gegengefärbt.

Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der bis dahin bei -20°C gelagerten Objektträger erfolgte im abgedunkelten Raum mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss) mit speziellen Farbfiltern für die Grün-, Rot- und Gelbfluoreszenzfärbung der Chromosomen. Die Chromosomen wurden mit 1000-facher Vergrößerung unter Ölimmersion betrachtet. Von den Blutproben zum Zeitpunkt vor der Therapie wurden pro Patient 500 sich in Mitose befindliche Zellkerne der Lymphozyten ausgewertet. Von den Blutproben nach der Therapie wurden pro Patient 300 Mitosen analysiert. Dabei wurden Mitosen mit und ohne Chromosomenaberrationen unterschieden und ausgezählt. Die Chromosomenaberrationen wurden noch einmal genauer unterteilt in einfache Austauschaberrationen (Chromosomen-Austausch zwischen 2 Chromosomen), komplexe Austauschaberrationen (Chromosomen-Austausch zwischen mehr als 2 Chromosomen) und multiple Austauschaberrationen (mehrere einfache Austauschaberrationen in einer Zelle) sowie aneuploide Zellen (einzelne Chromosomen sind mehr oder weniger als zweimal und Y-Chromosom mehr oder weniger als einmal vorhanden).

Bei der Auswertung der Austauschaberrationen wurde die partielle Rate an einfachen Austauschaberrationen pro Zelle $y_{S,E}$ berechnet. Diese ist definiert als Anzahl der einfachen chromosomalen Austauschaberrationen, beobachtet in Chromosomen 1, 2 und 4, geteilt durch die Anzahl der ausgewerteten Zellen.

2.5. Statistische Analyse

Die chromosomalen Austauschaberrationen wurden in jeweils 500 Zellen der Kontrollproben vor Beginn der Therapie und jeweils 300 Zellen in den 1 und 2 Jahre nach Ende der Therapie entnommenen Blutproben ausgezählt. Für jeden Zeitpunkt und jeden Patienten wurden die Chromosomenaberrationsraten $y_{S,E}$ berechnet. Da es sich bei den chromosomalen Austauschaberrationen um seltene Ereignisse handelt, folgen diese Daten der Poisson-Verteilung und die $y_{S,E}$ -Werte repräsentieren die Mittelwerte der entsprechenden Poisson-Verteilungen.

Anhand der Poisson-Verteilung wurden die 95%-Vertrauensbereiche für die Raten der chromosomalen Austauschaberrationen bestimmt. Zusätzlich wurde der Median anhand der $y_{S.E.}$ -Werte jeweils für die Blutproben vor Beginn der Therapie, nach 1 und nach 2 Jahren berechnet.

Mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests wurden jeweils die Patienten mit niedriger¹ und hoher² Chromosomenaberrationsrate verglichen. Dieser Vergleich wurde jeweils für die Blutproben der Kontrollgruppe, die Blutproben 1 Jahr nach Ende der Therapie und die Blutproben 2 Jahre nach Therapieende durchgeführt. Der Test wurde auf dem Niveau $\alpha = 0,05$ berechnet.

Durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest wurden die chromosomalen Aberrationsraten der Kontrollproben mit denen der Blutproben 1 Jahr nach Ende der Therapie und mit denen der Blutproben 2 Jahre nach Therapieende untereinander verglichen. Dabei wurden die $y_{S.E.}$ -Werte der Kontrollproben, die Werte nach 1 und nach 2 Jahren jeweils zu einer Ranggruppe zusammengefasst und als Gruppen untereinander verglichen. Der Test wurde auf dem Niveau $\alpha = 0,05$ durchgeführt.

Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Test wurde auf dem Niveau $\alpha = 0,05$ die Signifikanz der Werte (Kontrollwert, nach 1 und 2 Jahren) jeweils nur eines Patienten verglichen.

Auch hier wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Chromosomenaberrationsrate eines Patienten nach 1 und 2 Jahren post-Therapie nicht mehr signifikant erhöht ist.

¹ Werte \leq des Wertes des oberen 95%-Vertrauensbereiches

² Werte $>$ des Wertes des oberen 95%-Vertrauensbereiches

3. Ergebnisse

3.1. Chromosomenaberrationsraten in Patientenlymphozyten vor der Therapie sowie ein und zwei Jahre nach der Therapie

In den Metaphase-Lymphozyten, die aus dem peripheren Blut der Patienten hergestellt wurden, wurden die einfachen chromosomalen Austauschaberrationen $y_{S.E.}$ fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. In Abb. 3 sind Chromosomenaberrationsraten $y_{S.E.}$ in Lymphozyten der Patienten vor Beginn der Therapie (1), 1 Jahr (2) und 2 Jahre (3) nach Beendigung der Therapie aufgetragen. Die Ergebnisse sind als Boxplots dargestellt, die die Mediane sowie die 25%- und 75%-Quantile beinhalten.

Anhand der Abb.3 wird ersichtlich, dass die $y_{S.E.}$ -Werte in Lymphozyten der Patienten zum Zeitpunkt 1 Jahr und 2 Jahre nach Ende der Therapie gegenüber den Kontrollwerten vor der Therapie signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$) erhöht sind.

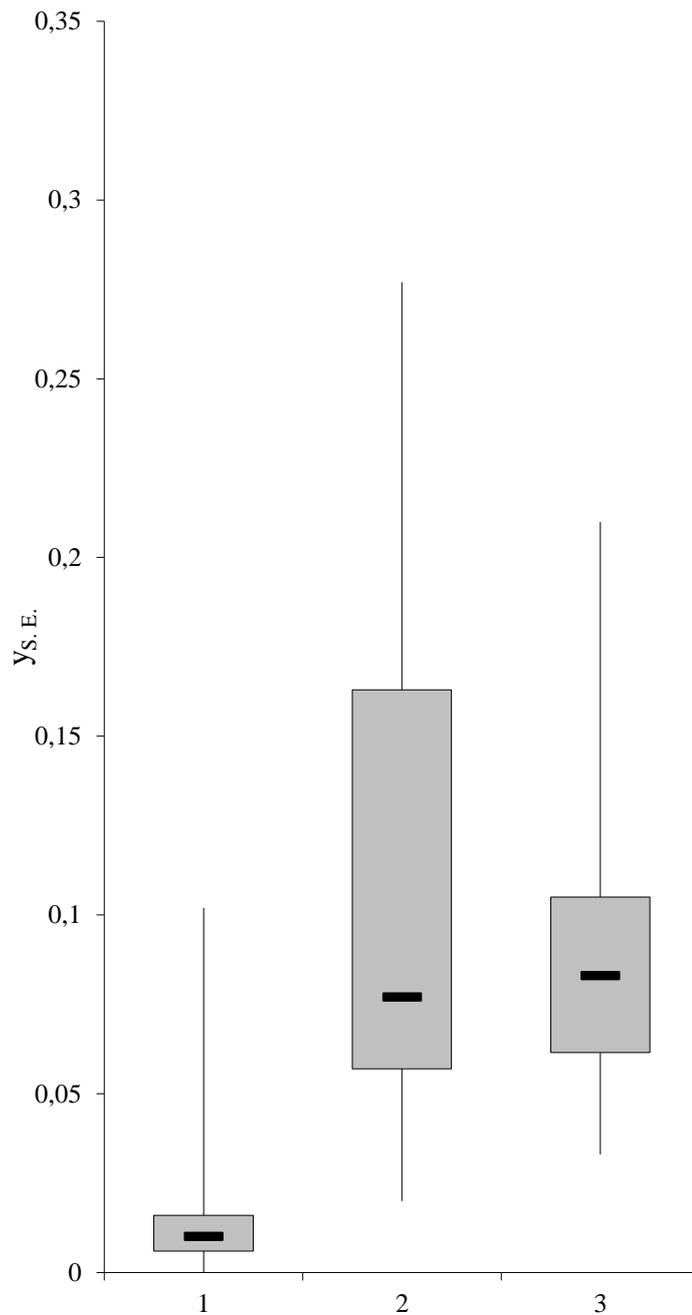
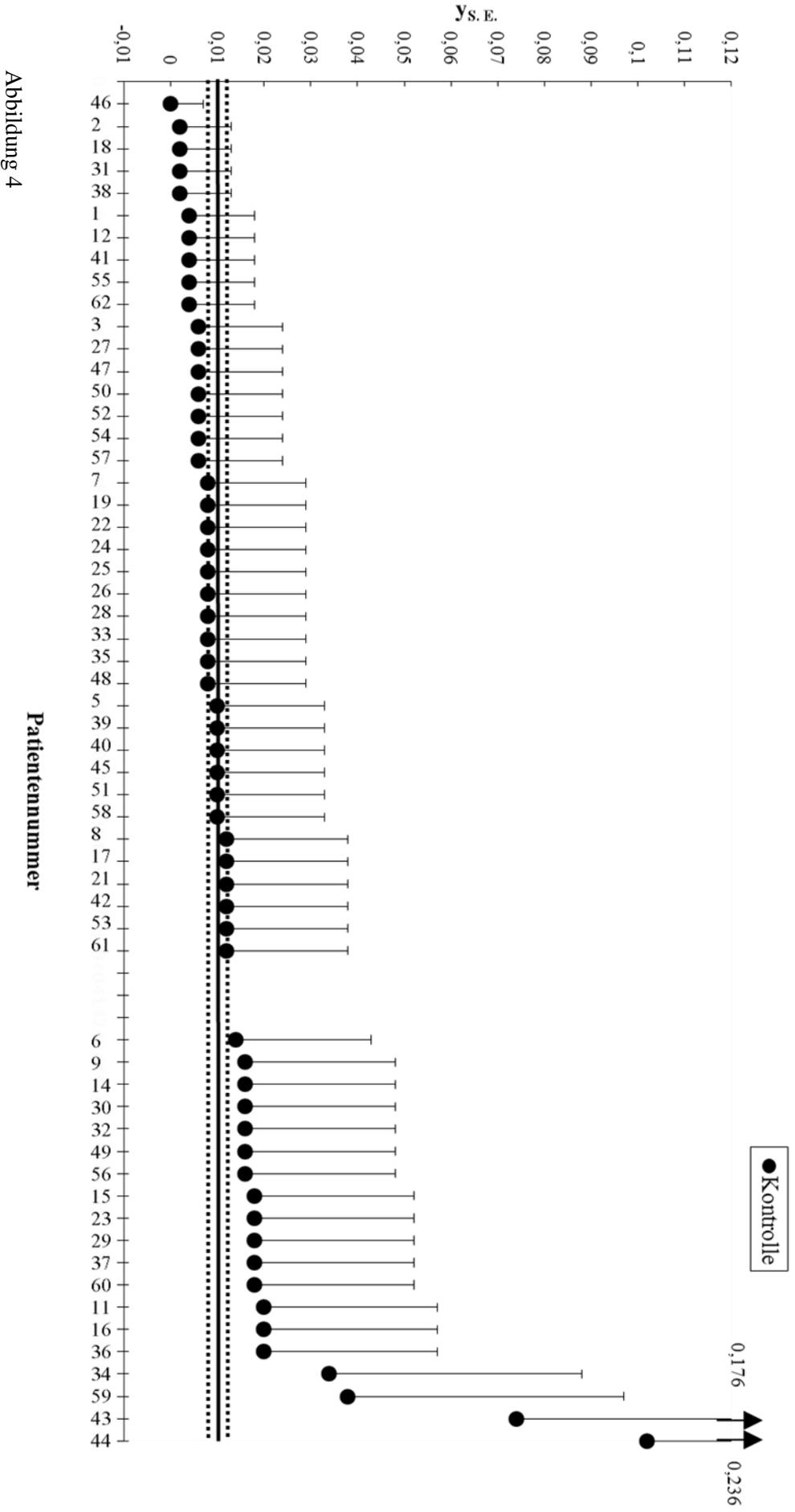


Abbildung 3

Aberrationsraten $y_{S.E.}$ in Lymphozyten der Patienten vor Beginn der Therapie (1), 1 Jahr nach Ende der Therapie (2) und 2 Jahre nach Ende der Therapie (3). In den grauen Boxen befinden sich jeweils die mittleren 50% der $y_{S.E.}$ -Werte. Die vertikalen Linien unterhalb der Boxen veranschaulichen die 25% der kleinsten Werte und die vertikalen Linien oberhalb der Boxen beinhalten die 25% der höchsten Werte. Die horizontalen schwarzen Linien in den grauen Boxen stellen jeweils den Median dar.

3.2. Chromosomale Austauschaberrationen vor Beginn der Therapie

In Abb.4 sind die Kontrollwerte, d.h. die Spontanaberrationsraten $y_{S.E.}$ vor Beginn der Therapie, geordnet entsprechend dem aufsteigendem $y_{S.E.}$ -Wert, aufgetragen. Bei den Patienten 4, 10, 13 und 20 fehlte die Kontrollprobe vor der Therapie. Die $y_{S.E.}$ -Werte liegen in den Kontrollproben zwischen 0 und 0,236 Austauschaberrationen pro Zelle. Der Median liegt bei 0,01.



Einfache chromosomale Austauschaberrationsraten $y_{s.e.}$ in den unbestrahlten Blutproben vor Beginn der Therapie (●), geordnet nach aufsteigendem $y_{s.e.}$ -Wert. Die vertikalen Balken τ repräsentieren die 95%-Poisson-Vertrauensbereiche. Die schwarze Linie — repräsentiert den Median $0 = 0,01$ und die gepunkteten Linien repräsentieren die 95%-Vertrauensbereiche des Medians $<0,008; 0,012>$.

3.3. Chromosomale Austauschaberrationen nach der Therapie

In Abb.5 sind die Aberrationsraten $y_{S.E.}$ der Lymphozyten, welche den Patienten 1 und 2 Jahre nach der Therapie entnommen wurden, dargestellt zusammen mit den entsprechenden Kontrollwerten vor Beginn der Therapie. Bei den Patienten 4, 10, 13 und 20 fehlt die Kontrollprobe vor der Therapie.

Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest zeigte, dass die $y_{S.E.}$ -Werte der Ranggruppe 1 Jahr nach Ende der Therapie im Vergleich zu den $y_{S.E.}$ -Werten der Ranggruppe der Kontrollproben vor Beginn der Therapie signifikant unterschiedlich sind ($p < 0,05$). Auch die $y_{S.E.}$ -Werte der Ranggruppe 2 Jahre nach Ende der Therapie unterscheiden sich signifikant, auf dem 95%-Niveau, von den $y_{S.E.}$ -Kontrollwerten vor Beginn der Therapie.

Die $y_{S.E.}$ -Werte zum Zeitpunkt 2 Jahre nach der Therapie erscheinen im Diagramm trendmäßig niedriger, als die Werte 1 Jahr nach der Therapie. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest zeigt jedoch, dass die $y_{S.E.}$ -Werte 1 und 2 Jahre nach der Therapie nicht signifikant voneinander unterschiedlich sind ($p > 0,05$).

Vergleicht man die $y_{S.E.}$ -Werte (Kontrollwert, Wert nach 1 und 2 Jahren) jeweils eines einzelnen Patienten mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests untereinander, so wird ersichtlich, dass fast alle $y_{S.E.}$ -Werte zum Zeitpunkt 1 und 2 Jahre nach der Therapie bis auf wenige Ausnahmen im Vergleich zu den Kontrollwerten vor Beginn der Therapie auf dem 95%-Niveau signifikant erhöht sind.

Beim Vergleich des Kontrollwertes mit dem Wert zum Zeitpunkt 1 Jahr nach der Therapie ist bei fast allen Patienten der $y_{S.E.}$ -Wert signifikant erhöht. Nur bei den Patienten 34, 43 und 44 ist der Wert nach 1 Jahr nicht signifikant erhöht. Allerdings liegen bei diesen drei Patienten besonders hohe Kontrollwerte vor, sodass eine weitere Erhöhung durch die Therapie deshalb nicht nachzuweisen war.

Beim Vergleich des Kontrollwertes mit dem Wert nach 2 Jahren waren lediglich die Werte der Patienten 11 und 23 nicht mehr signifikant erhöht.

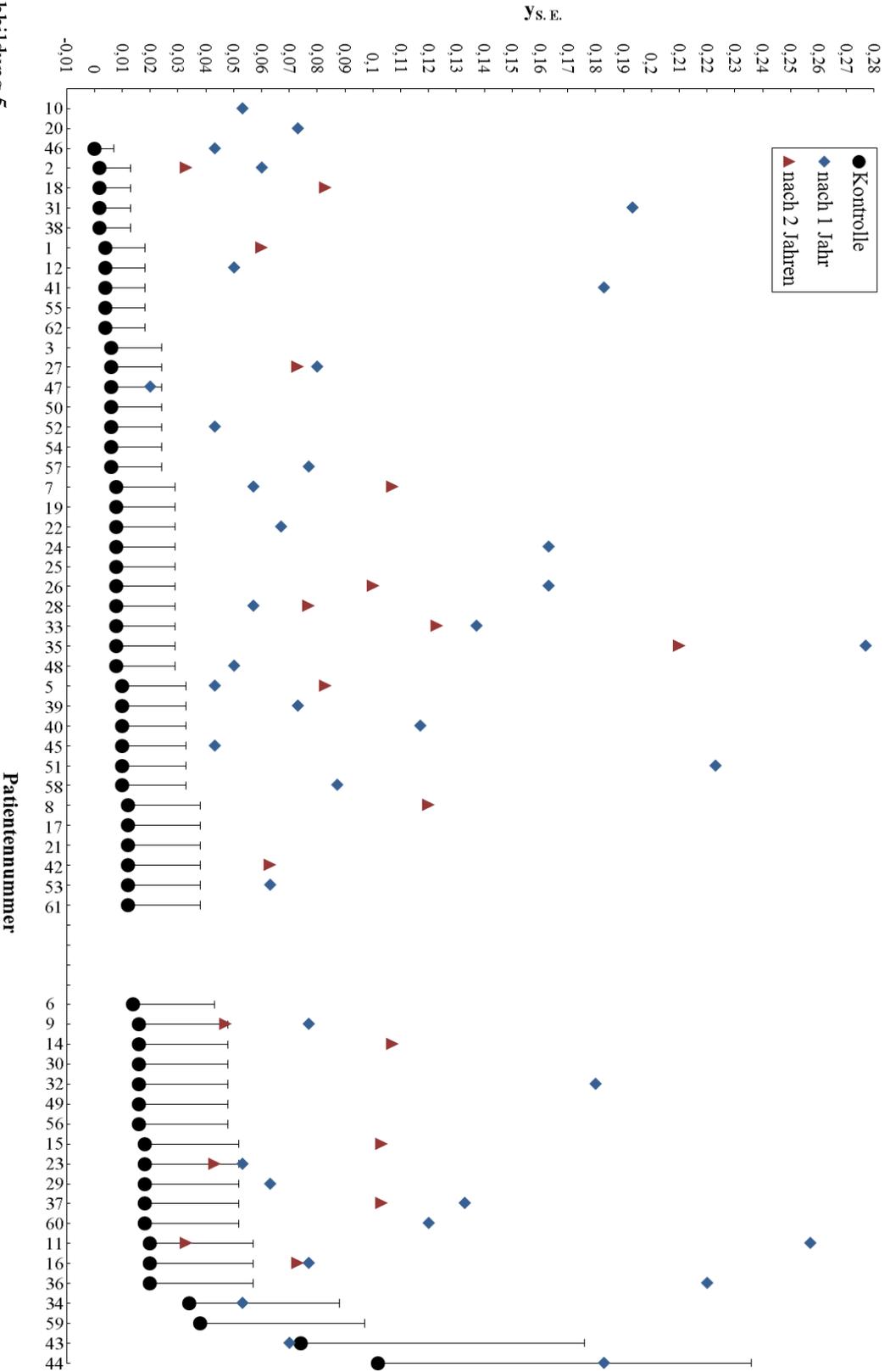


Abbildung 5

Einfache chromosomale Austauschaberrationsraten $y_{s.E}$ in den unbestrahlten Blutproben vor Beginn der Therapie (●), 1 Jahr nach Ende der Therapie (◆), 2 Jahre nach Ende der Therapie (▲) nach aufsteigendem $y_{s.E}$ -Kontrollwert geordnet. Die vertikalen Balken \top repräsentieren die 95%-Poisson-Vertrauensbereiche, welche auf Grund der Übersichtlichkeit nur für die unbestrahlten Kontrollproben dargestellt sind.

In Abb.6 und Abb.7 sind jeweils die Patienten in Gruppen mit niedriger und hoher Aberrationsrate zum Zeitpunkt 1 und 2 Jahren nach Ende der Therapie eingeordnet. Die vertikal verlaufende Punkt-Strich-Linie trennt dabei die Gruppen mit der niedrigen und hohen chromosomalen Aberrationsrate. Diese Grenzlinie wurde gewählt als der obere 95%-Vertrauensbereich des Medians.

Mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests konnte gezeigt werden, dass zu allen 3 Zeitpunkten der Blutentnahme jeweils bei der Patientengruppe mit der höheren chromosomalen Aberrationsrate eine signifikant höhere Anzahl an einfachen Austauschaberrationen vorlag ($p < 0,05$).

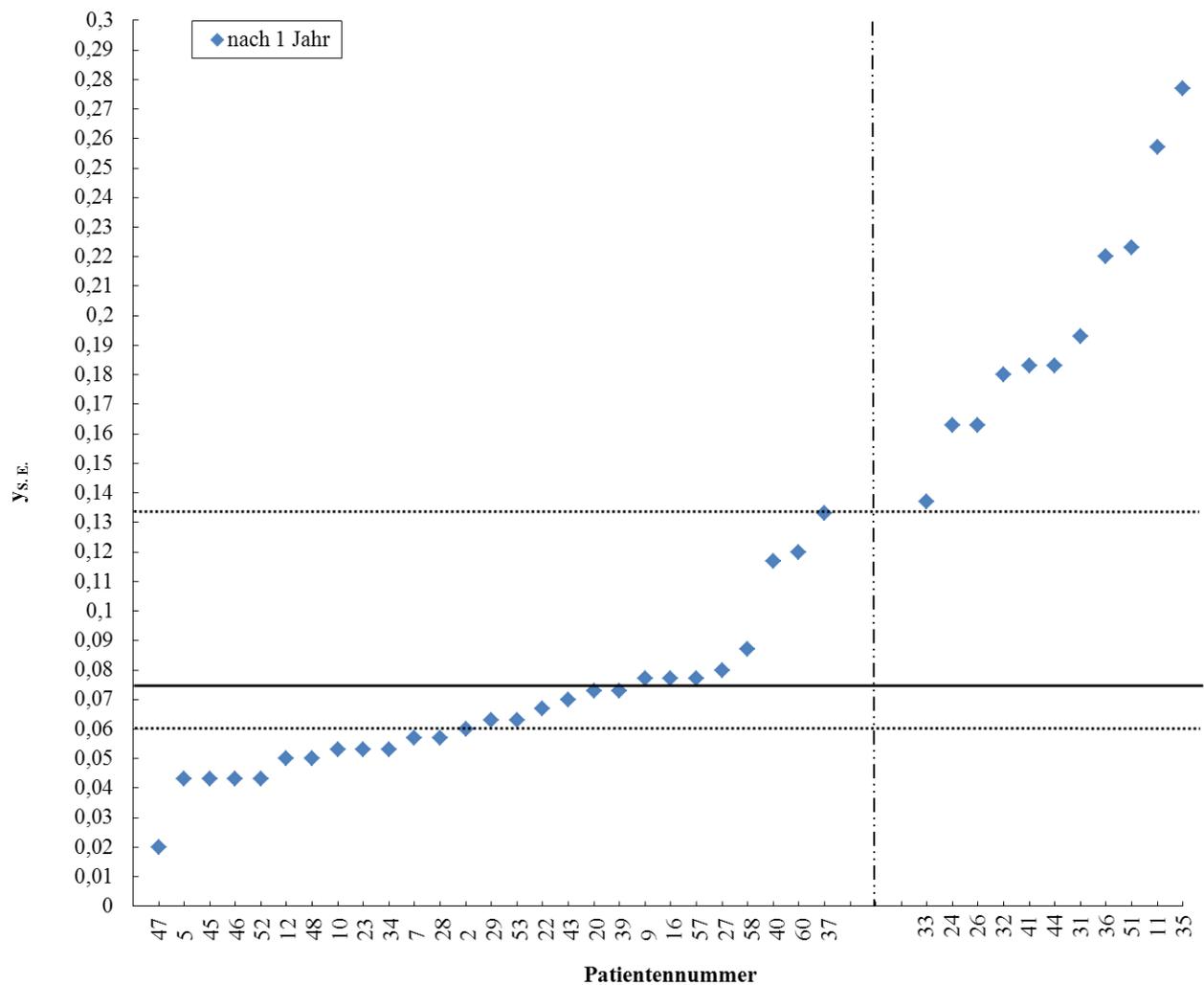


Abbildung 6

Einfache chromosomale Austauschaberrationen 1 Jahr nach Ende der Therapie (◆) nach aufsteigendem $y_{S.E.}$ -Wert geordnet. Die schwarze Linie — repräsentiert den Median $0 = 0,075$ und die gepunkteten Linien repräsentieren die 95%-Vertrauensbereiche des Medians $\langle 0,06; 0,133 \rangle$. Die Punkt-Strich-Linie |⋮ trennt die Gruppen mit niedriger und hoher chromosomaler Aberrationsrate.

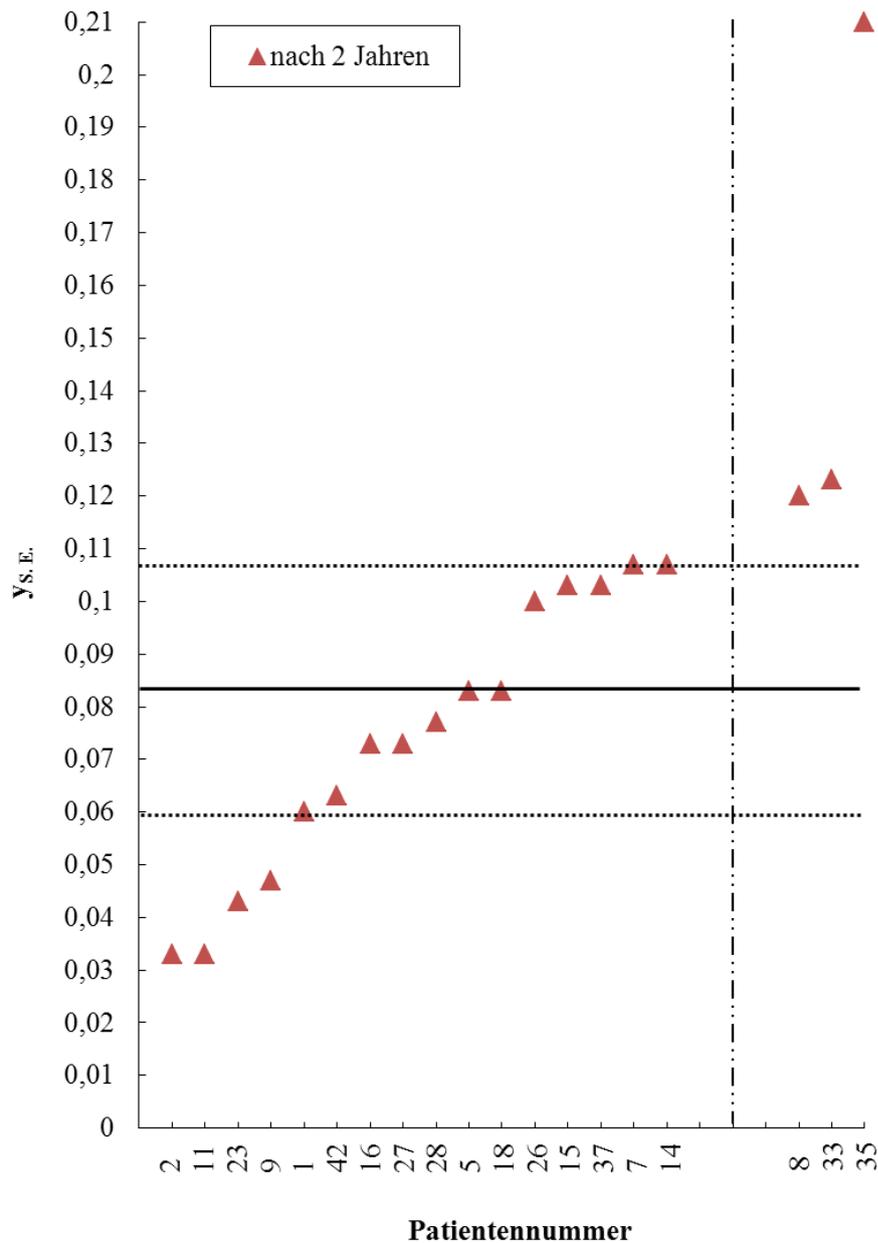


Abbildung 7

Einfache chromosomale Austauschaberrationen 2 Jahre nach Ende der Therapie (▲) nach aufsteigendem $y_{s.e.}$ -Wert geordnet. Die schwarze Linie — repräsentiert den Median $0 = 0,083$ und die gepunkteten Linien repräsentieren die 95% Vertrauensbereiche des Medians $\langle 0,06; 0,107 \rangle$. Die Punkt-Strich-Linie | trennt die Gruppen mit niedriger und hoher chromosomaler Aberrationsrate.

3.4. Multiple chromosomale Austauschaberrationen

Bei 7% der Kontrollblutproben vor Beginn der Therapie traten in mehreren Zellen multiple chromosomale Austauschaberrationen auf (Abb.8). Bereits nach 1 Jahr (Abb.9) hat sich die Anzahl der Proben mit mehreren betroffenen Zellen verzehnfacht (72%) und auch 2 Jahre nach Ende der Therapie (Abb.10) ist die Anzahl der Proben mit mehreren Zellen mit multiplen Austauschaberrationen nicht gesunken (74%). Auffällig ist, dass 1 Jahr nach Ende der Therapie (Abb.9) in den Proben, in denen mehrere betroffenen Zellen vorhanden sind, in 15% der Fälle mehr als 10 Zellen mit multiplen chromosomalen Austauschaberrationen vorliegen. Diese Erhöhung ist 2 Jahre nach Ende der Therapie wieder verschwunden.

Insgesamt sind bei 29% der Patienten vor der Therapie, 85% der Patienten nach 1 Jahr und 84% der Patienten 2 Jahre nach Ende der Therapie Zellen mit multiplen chromosomalen Austauschaberrationen zu beobachten.

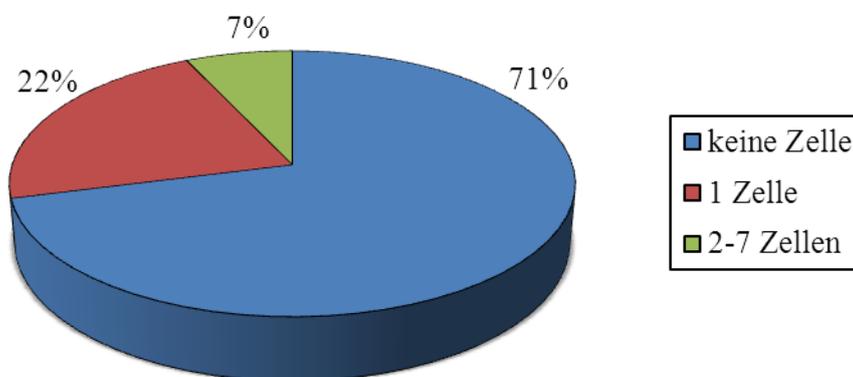


Abbildung 8

Relative Anzahlen von Lymphozyten mit multiplen Austauschaberrationen in den Blutproben vor Beginn der Therapie.

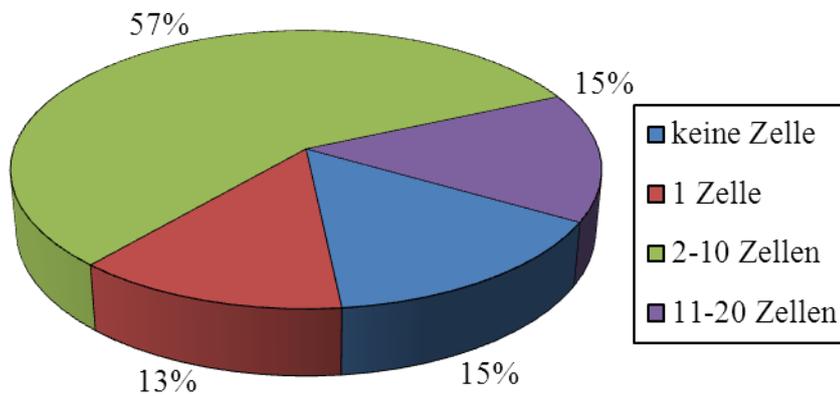


Abbildung 9

Relative Anzahlen von Lymphozyten mit multiplen Austauschaberrationen in den Blutproben 1 Jahr nach Ende der Therapie.

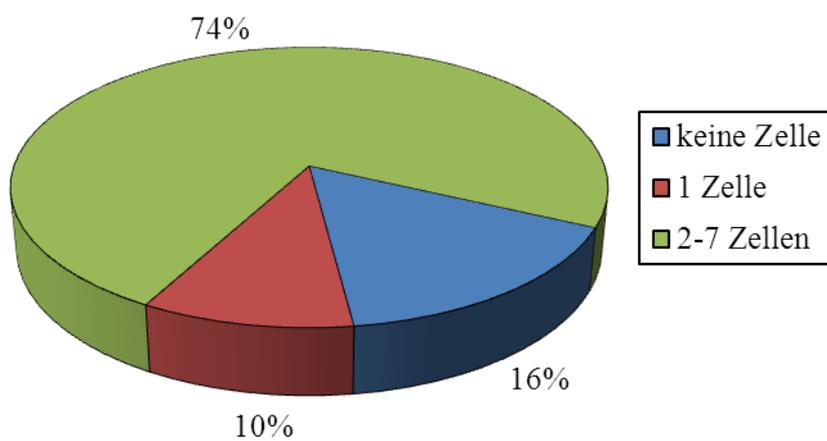


Abbildung 10

Relative Anzahlen von Lymphozyten mit multiplen Austauschaberrationen in den Blutproben 2 Jahre nach Ende der Therapie.

3.5. Komplexe chromosomale Austauschaberrationen

Bei den Kontrollproben vor Beginn der Therapie sind komplexe chromosomale Austauschaberrationen selten. Lediglich bei 10% der Patienten liegt jeweils eine Zelle mit einer komplexen chromosomalen Austauschaberration vor (Abb.11). Der Ursprung dieser komplexen Aberration ist unbekannt. 1 Jahr nach Ende der Therapie hat sich die Anzahl der Proben mit betroffenen Zellen verdreifacht (Abb.12). Zusätzlich sind zu den Blutproben mit einer betroffenen Zelle (26%) Patientenproben mit mehreren betroffenen Zellen (18%) vorhanden, sodass nach einem Jahr insgesamt 44% der Patienten Zellen mit komplexen chromosomalen Austauschaberrationen aufwiesen.

Auch 2 Jahre nach Ende der Therapie liegt immer noch bei 32% der Patienten eine Zelle mit komplexen chromosomalen Austauschaberrationen vor (Abb.13).

Insgesamt sind bei 10% der Patienten vor der Therapie, bei 44% der Patienten 1 Jahr nach Ende der Therapie und bei 32% der Patienten nach 2 Jahren Zellen mit komplexen chromosomalen Austauschaberrationen vorhanden.

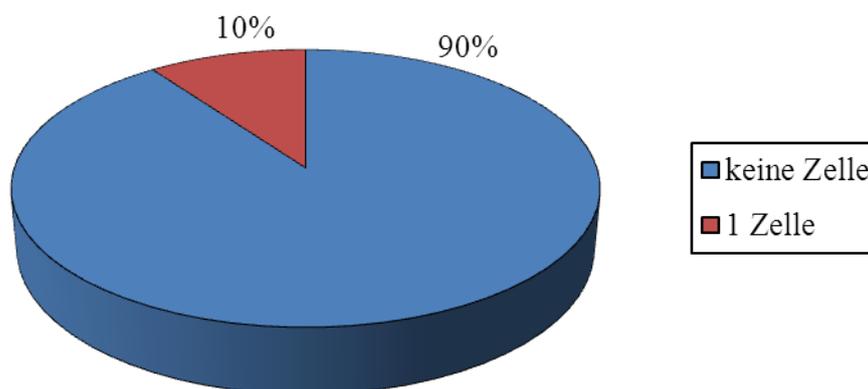


Abbildung 11

Relative Anzahl von Lymphozyten mit komplexen chromosomalen Austauschaberrationen in den Blutproben vor Beginn der Therapie.

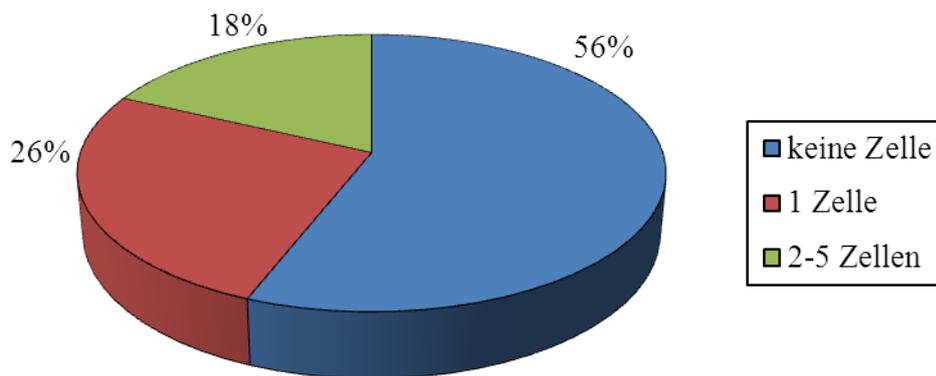


Abbildung 12

Relative Anzahlen von Lymphozyten mit komplexen chromosomalen Austauschaberrationen in den Blutproben 1 Jahr nach Ende der Therapie.

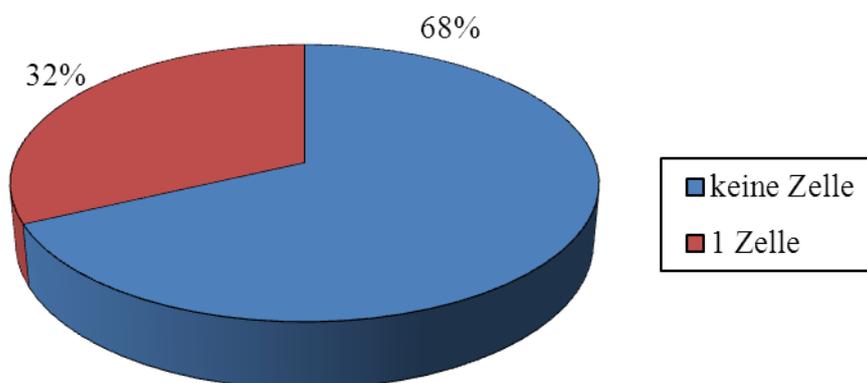


Abbildung 13

Relativ Anzahl von Lymphozyten mit komplexen chromosomalen Austauschaberrationen in den Blutproben 2 Jahre nach Ende der Therapie.

3.6. Aneuploide Zellen

In den Patientenblutproben traten als aneuploide Veränderungen Mono- oder Trisomien auf. Bei allen aneuploiden Zellen, egal zu welchem Zeitpunkt die Blutentnahme erfolgte, war meist nur eins der Chromosomen 1,2 oder 4 betroffen. Dabei kamen Mono- und Trisomien gleichhäufig vor.

Bei den Kontrollproben vor der Therapie sind bei 9% der Patienten bereits Zellen mit aneuploidem Chromosomensatz vorhanden (Abb.14).

1 Jahr nach Ende der Therapie (Abb.15) hat sich die Anzahl der Blutproben mit aneuploiden Zellen verdreifacht (33%).

Nach 2 Jahren ist die Anzahl der Patienten mit aneuploiden Zellen allerdings wieder auf 5% gesunken (Abb.16).

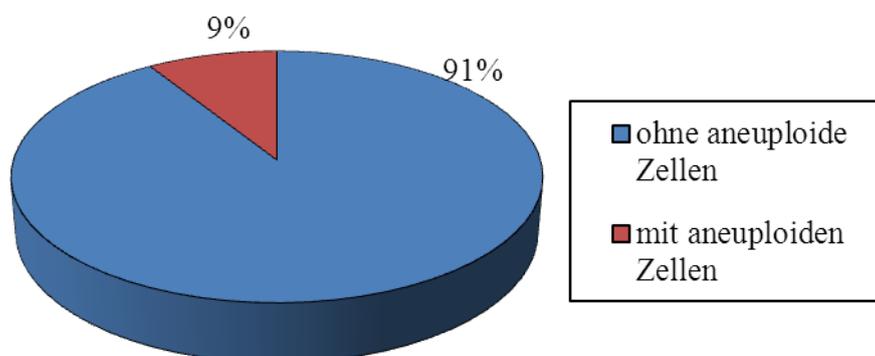


Abbildung 14

Relative Anzahl von aneuploiden Lymphozyten in den Blutproben vor Beginn der Therapie.

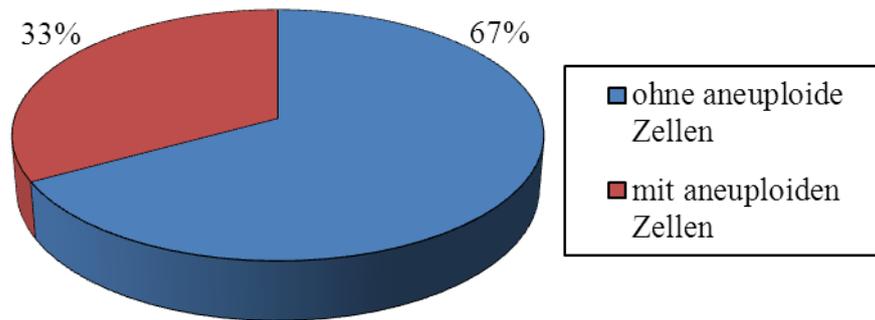


Abbildung 15

Relative Anzahl von aneuploiden Lymphozyten in den Blutproben 1 Jahr nach Ende der Therapie.

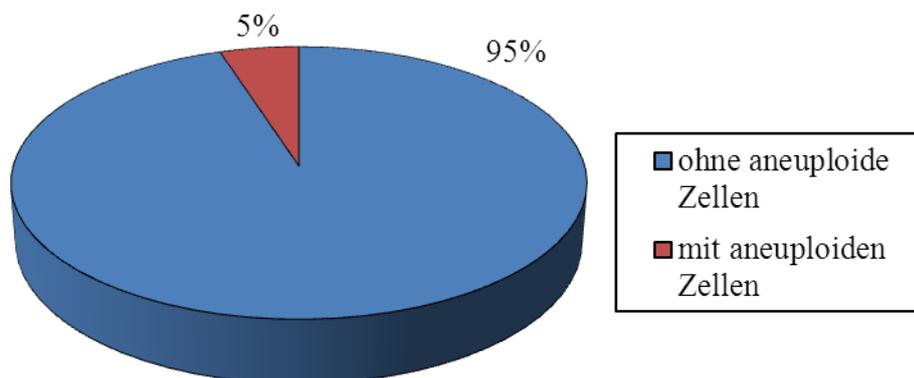


Abbildung 16

Relative Anzahl von aneuploiden Lymphozyten in den Blutproben 2 Jahre nach Ende der Therapie.

3.7. Einfluss des Alters auf die einfachen chromosomalen Austauschaberrationen in den Kontrollblutproben vor Beginn der Therapie

Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Kontrollblutentnahme vor Beginn der Therapie lag zwischen 51 und 84 Jahren. Das Medianalter beträgt 72 Jahre. Bei den Patienten 4, 10, 13 und 20 fehlt die Blutprobe vor Beginn der Therapie. Zur einfacheren Veranschaulichung wurde das Alter der Patienten in 5-Jahres-Gruppen aufgetragen. Das Diagramm in Abb.17 zeigt, dass die Mehrheit der spontanen $y_{S.E.}$ -Werte in einem Bereich zwischen 0 und 0,02 liegt. Lediglich 4 Patienten haben Outliner-Werte außerhalb dieses Bereiches bis zu 0,102.

Daraus wird ersichtlich, dass das Alter keinen Einfluss auf das Ausmaß der einfachen chromosomalen Austauschaberrationen hat, sondern die Chromosomenschäden vor der Therapie unabhängig vom Alter auftreten.

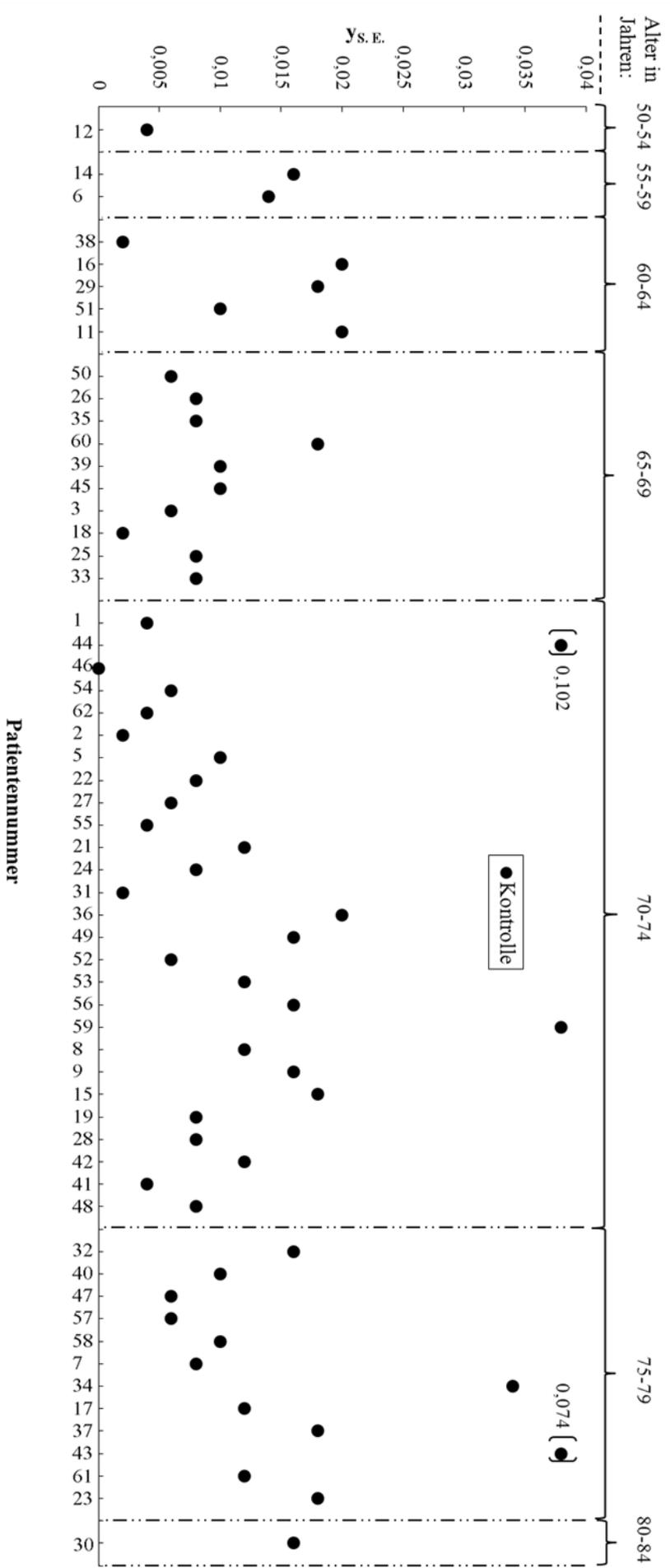


Abbildung 17

Einfache chromosomale Austauschaberrationsraten $y_{s.E.}$ (●) in den unbestrahlten Blutproben vor Beginn der Therapie, geordnet nach dem aufsteigendem Alter der Patienten.

3.8. Tumorstaging und chromosomale Austauschaberrationsraten in Lymphozyten der Kontrollblutproben vor Beginn der Therapie

Zur besseren Veranschaulichung wurden die Patienten bezüglich der TNM-Klassifikation ihres Prostatakarzinoms in Abb.18 in 3 Gruppen eingeteilt (T1c, T2a bis T2c und T3a bis T3c). Bei den Patienten 4, 10, 13 und 20 fehlen die Blutproben vor Beginn der Therapie.

Aus dem Diagramm wird ersichtlich, dass in allen 3 Gruppen jeweils niedrige und hohe $y_{S.E.}$ -Werte vorhanden sind, unabhängig davon, ob ein niedriges oder hohes TNM-Stadium vorlag. Daraus lässt sich schließen, dass die Rate an einfachen chromosomalen Austauschaberrationen vor Beginn der Therapie nicht vom TNM-Stadium des Prostatakarzinoms abhängig ist.

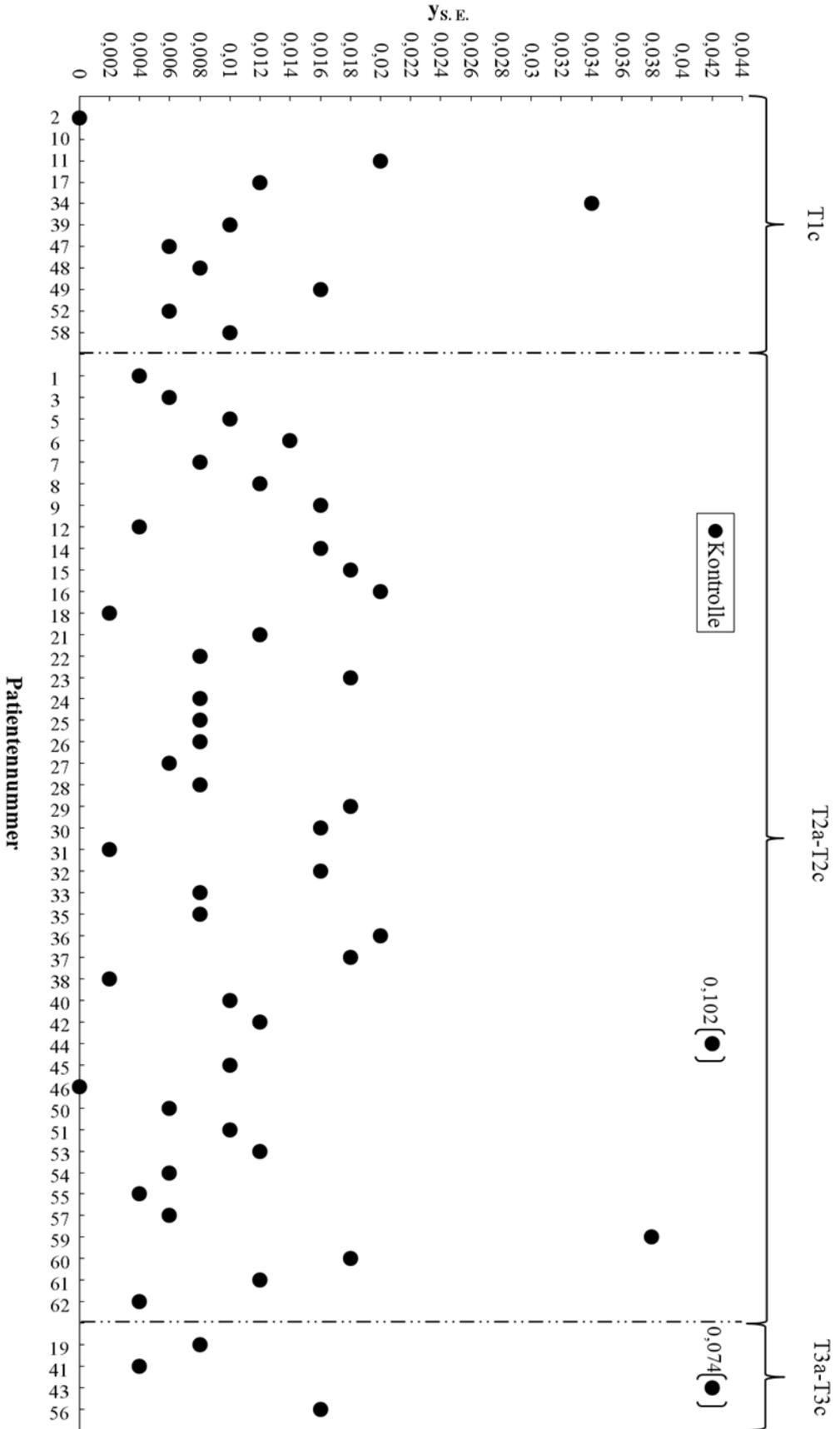


Abbildung 18

Einfache chromosomale Austauschaberrationsraten $y_{s.e.}$ (●) in den unbestrahlten Blutproben vor Beginn der Therapie, geordnet nach der TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms.

3.9. Einfluss von Belastungsfaktoren auf die einfachen chromosomalen Austauschaberrationen in den Kontrollblutproben vor Beginn der Therapie

Einfluss der beruflichen Schadstoffexposition

Bei 24 von 37 Patienten (65%) lag eine berufliche Schadstoffexposition vor. Bei 25 von 62 Patienten fehlt die Berufsanamnese. Die Patienten mit beruflicher Schadstoffexposition sind in Abb.19 dargestellt.

Der Median der $y_{S.E.}$ -Werte für einfache chromosomale Austauschaberrationen bei Patienten mit beruflicher Schadstoffbelastung beträgt 0,008. Der sich als Outliner darstellende $y_{S.E.}$ -Wert von Patient 43 wurde nicht mit in die Medianberechnung einbezogen, da es sich am wahrscheinlichsten um eine genetische Disposition dieses Patienten handelt.

Im Vergleich dazu ist der Median der $y_{S.E.}$ -Werte bei Patienten ohne berufliche Schadstoffexposition mit 0,01 nahezu gleich groß.

Zum einen wird daraus ersichtlich, dass der Großteil der Patienten mit Prostatakarzinom im Beruf schadstoffexponiert war. Zum anderen zeigt sich, dass es allerdings in diesem Fall keinen Unterschied im Ausmaß der chromosomalen Vorschädigung in den Lymphozyten im Vergleich zu den Patienten ohne berufliche Schadstoffexposition gibt.

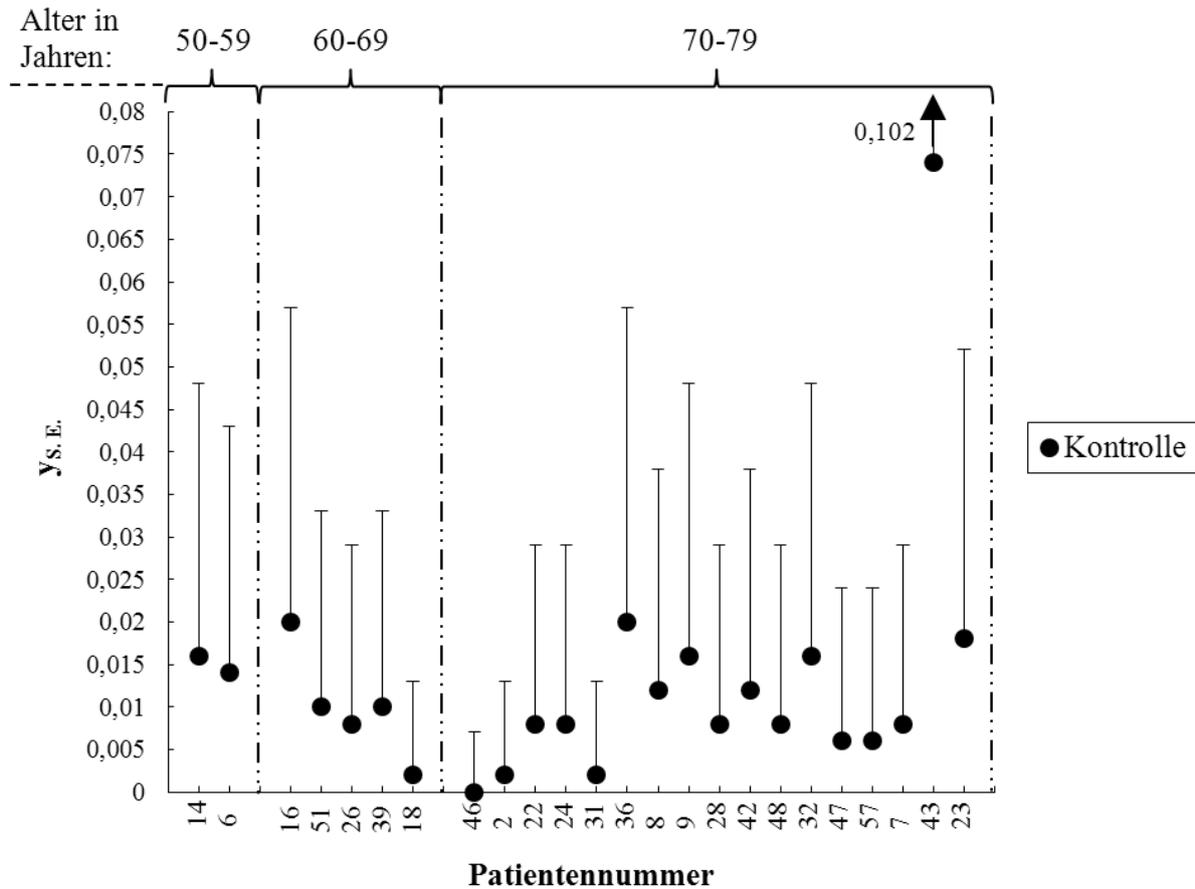


Abbildung 19

Einfache chromosomale Austauschaberrationen $y_{S.E.}$ in den unbestrahlten Blutproben vor Beginn der Therapie (●) bei Patienten mit beruflicher Belastung, geordnet nach aufsteigendem Alter. Die vertikalen Balken \top repräsentieren die 95%-Poisson-Vertrauensbereiche.

Einfluss mehrerer gleichzeitig vorhandener Belastungsfaktoren

Von den Patienten mit beruflicher Schadstoffexposition und negativer Familienanamnese sind 25% Raucher. Dies wird in Abb.20 ersichtlich. Daraus ergibt sich, dass bei 75% der Patienten mit negativer Familienanamnese nur ein Belastungsfaktor vorliegt (berufliche Schadstoffexposition) und bei 25% als zweiter Belastungsfaktor der positive Nikotinstatus vorhanden ist.

In Abb.21 sind die Patienten mit beruflicher Belastung sowie positiver Familienanamnese mit und ohne Nikotinkonsum dargestellt. Es wird ersichtlich, dass bei 40% der beruflich Schadstoffexponierten insgesamt 3 Risikofaktoren vorliegen.

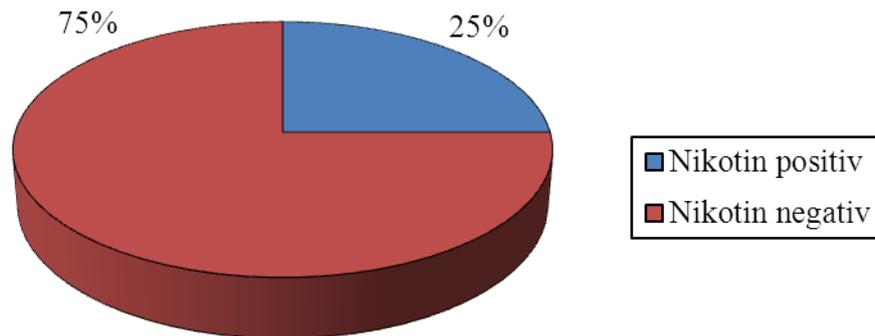


Abbildung 20

Relative Anzahl von Prostatakrebspatienten mit beruflicher Belastung und negativer Familienanamnese mit und ohne Nikotinkonsum.

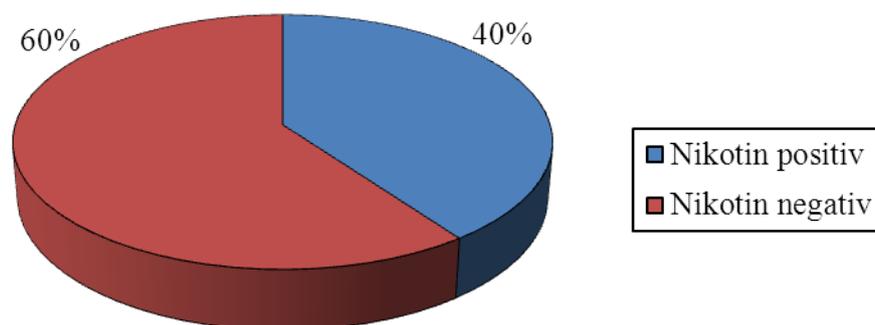


Abbildung 21

Relative Anzahl von Prostatakrebspatienten mit beruflicher Belastung und positiver Familienanamnese mit und ohne Nikotinkonsum.

3.10. Nebenwirkungen an Harnblase und Darm

Akute Nebenwirkungen an Harnblase und Darm

Insgesamt 56 von 61 Studienteilnehmern (92%) wiesen akute Nebenwirkungen an Harnblase oder Darm oder an beiden Organen auf. In Abb.22 und Abb.23 sind die akuten Nebenwirkungen an Harnblase und Darm zur einfacheren Veranschaulichung jeweils getrennt dargestellt. Bei mehr als der Hälfte der Patienten (57%) traten allerdings akute Nebenwirkungen sowohl an der Harnblase als auch am Darm auf.

Die akute Zystitis und die akute Proktitis traten jeweils bei etwa 75% der Patienten auf (Abb.22, Abb.23). Bei beiden Organen überwogen die Nebenwirkungen I. Grades (51-54%). Die Nebenwirkungen III. Grades kamen nur sehr selten vor (2%). Ein Viertel der Patienten hatte jeweils keine akuten Nebenwirkungen an Harnblase oder Darm.

Zusammenfassend wird ersichtlich, dass die akuten Nebenwirkungen an Harnblase oder Darm jeweils fast gleich häufig auftraten.

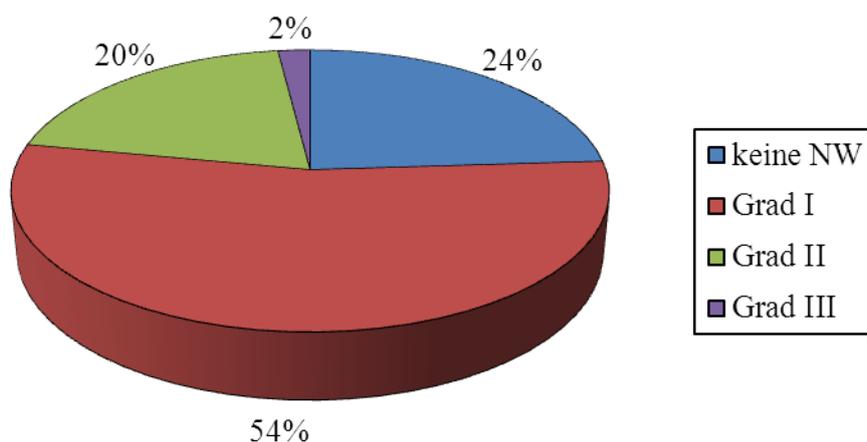


Abbildung 22

Relative Häufigkeiten der akuten Nebenwirkungen verschiedener Grade an der Harnblase.

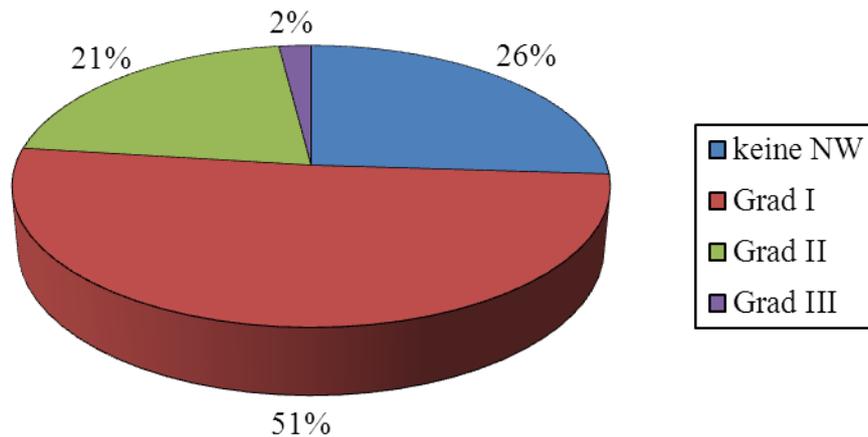


Abbildung 23

Relative Häufigkeiten der akuten Nebenwirkungen verschiedener Grade am Darm.

Akute Nebenwirkungen in Abhängigkeit von der Bestrahlungstechnik

Zur Veranschaulichung der akuten Nebenwirkungen in Abhängigkeit von der Bestrahlungstechnik sind in Abb.24 und Abb.25 die Patienten mit akuten Nebenwirkungen an Harnblase und Darm in einem Diagramm zusammengefasst.

Aus den Diagrammen wird ersichtlich, dass es keine Unterschiede im Ausmaß der Nebenwirkungen zwischen den verschiedenen Bestrahlungsoptionen gibt. Sowohl die Hälfte der Patienten mit RapidArc- oder HDR + RapidArc-Bestrahlung (Abb.24) als auch die Hälfte der Patienten mit anderen Bestrahlungstechniken* (Abb.25) wiesen nur leichte Nebenwirkungen I. Grades auf. Circa 20% der Patienten in beiden Gruppen litten unter schweren Nebenwirkungen II. oder III. Grades. Weitere rund 20% aller Patienten gaben gleichzeitig leichte und schwere Nebenwirkungen von Grad I und Grad II oder III an. Nur circa 10% der Patienten hatten, unabhängig von der jeweiligen Bestrahlungstechnik, keine akuten Nebenwirkungen an Harnblase und Darm.

* HDR+IMRT, HDR+4-Felder, HDR+5-Felder, IMRT, LDR, 4-Felder, 5-Felder

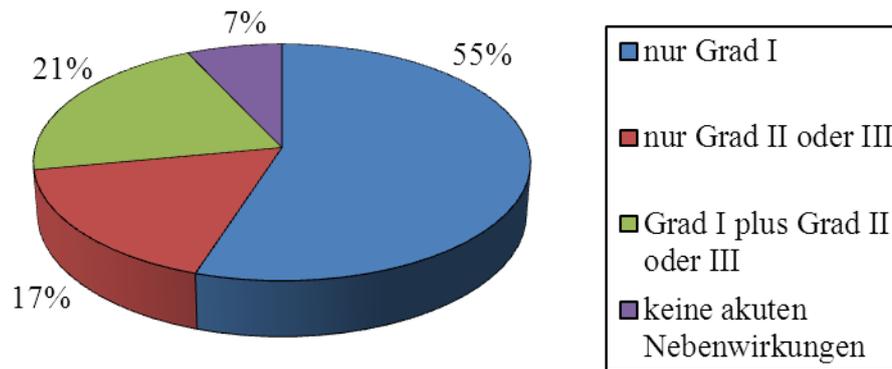


Abbildung 24

Relative Häufigkeiten der akuten Nebenwirkungen verschiedener Grade an Harnblase und Darm bei Patienten, die mit RapidArc- und HDR + RapidArc-Techniken behandelt wurden.

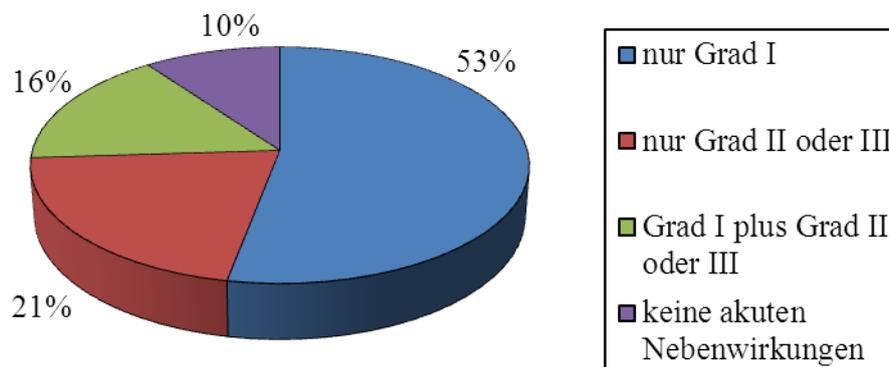


Abbildung 25

Relative Häufigkeiten der akuten Nebenwirkungen verschiedener Grade an Harnblase und Darm bei Patienten, die mit anderen Bestrahlungstechniken* behandelt wurden.

* HDR+IMRT, HDR+4-Felder, HDR+5-Felder, IMRT, LDR, 4-Felder, 5-Felder

Späte Nebenwirkungen an Harnblase und Darm

Insgesamt 20 von 59 Studienteilnehmern (34%) wiesen späte Nebenwirkungen an Harnblase oder Darm oder an beiden Organen auf. Im Vergleich zu den akuten Nebenwirkungen sind 2/3 der Patienten weniger betroffen. In Abb.26 und Abb.27 werden die späten Nebenwirkungen an Harnblase und Darm zur einfacheren Veranschaulichung erneut jeweils getrennt betrachtet. Nur bei 14% der Patienten traten sowohl späte Nebenwirkungen an der Harnblase als auch am Darm auf.

Bei den späten Nebenwirkungen kehrt sich das Verhältnis zwischen Patienten mit und ohne Nebenwirkungen im Vergleich zum Verhältnis bei den akuten Nebenwirkungen um. Späte Nebenwirkungen an der Harnblase wurden bei 27% der Studienteilnehmer beobachtet und ebenfalls nur 20% der Patienten litten unter Nebenwirkungen am Darm. Bei beiden Organen überwiegen die späten Nebenwirkungen I. Grades (13 bis 19%), ähnlich wie bei den akuten Nebenwirkungen. Die Nebenwirkungen II. und III. Grades kamen nur selten vor (7 bis 8%). Im Gegensatz zu den akuten Nebenwirkungen hatten etwa 75% der Patienten keine späten Nebenwirkungen an Harnblase oder Darm.

Auch bei den späten Nebenwirkungen traten Zystitis und Proktitis jeweils fast mit gleicher Häufigkeit auf.

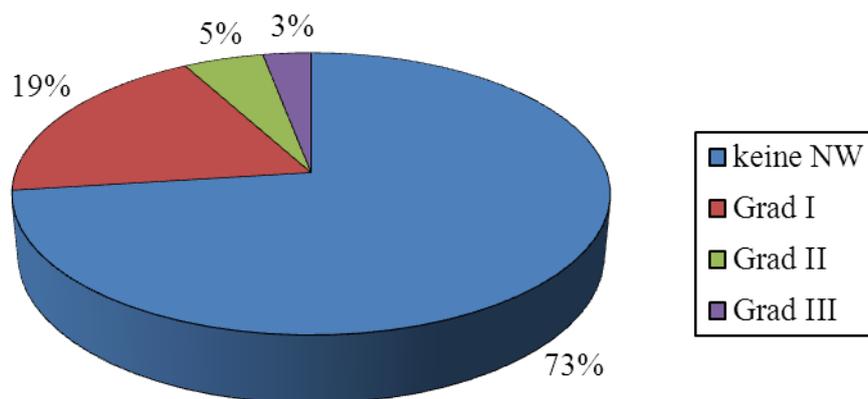


Abbildung 26

Relative Häufigkeiten der späten Nebenwirkungen verschiedener Grade an der Harnblase.

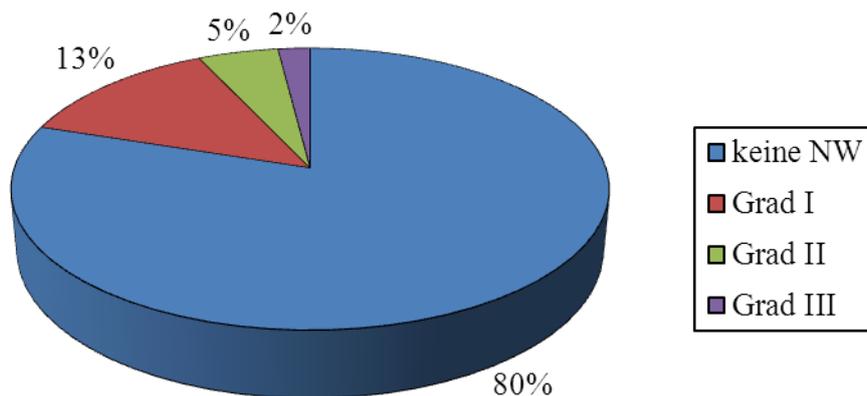


Abbildung 27

Relative Häufigkeiten der späten Nebenwirkungen verschiedener Grade am Darm.

Späte Nebenwirkungen in Abhängigkeit von der Bestrahlungstechnik

Zur Veranschaulichung der späten Nebenwirkungen in Abhängigkeit von der Bestrahlungstechnik sind in Abb.28 und Abb.29 die Patienten mit späten Nebenwirkungen an Harnblase und Darm ebenfalls in einem Diagramm zusammengefasst.

Auch in diesen Diagrammen wird ersichtlich, dass das Verhältnis von Patienten mit und ohne späte Nebenwirkungen im Vergleich zu den akuten Nebenwirkungen umgekippt ist. Sowohl die Patienten mit RapidArc- oder HDR + RapidArc-Bestrahlung (Abb.28) als auch die Patienten, die mit anderen Bestrahlungstechniken* behandelt wurden (Abb.29), wiesen zu fast 70% keine späten Nebenwirkungen an Harnblase oder Darm auf. Es fällt auf, dass bei den übrigen Patienten mit RapidArc- oder HDR + RapidArc-Bestrahlung (Abb.28) überwiegend leichte Spätnebenwirkungen I. Grades auftraten und bei den restlichen Patienten mit anderen Bestrahlungstechniken* (Abb.29) hingegen hauptsächlich schwere Nebenwirkungen II. oder III. Grades auftraten.

* HDR+IMRT, HDR+4-Felder, HDR+5-Felder, IMRT, LDR, 4-Felder, 5-Felder

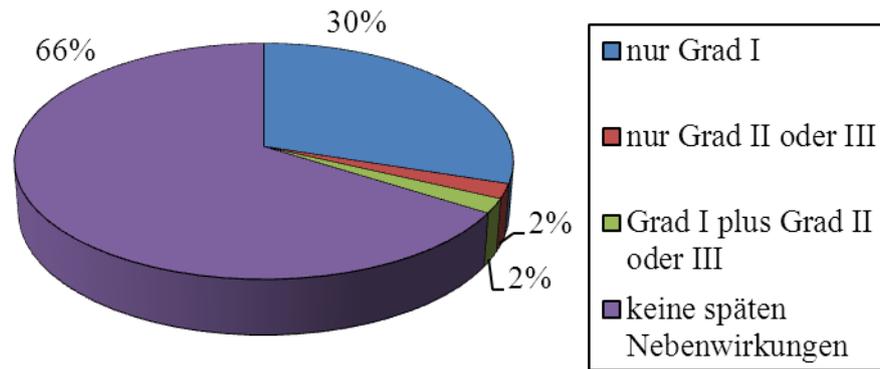


Abbildung 28

Relative Häufigkeiten der späten Nebenwirkungen verschiedener Grade an Harnblase und Darm bei Patienten, die mit RapidArc- und HDR + RapidArc-Techniken behandelt wurden.

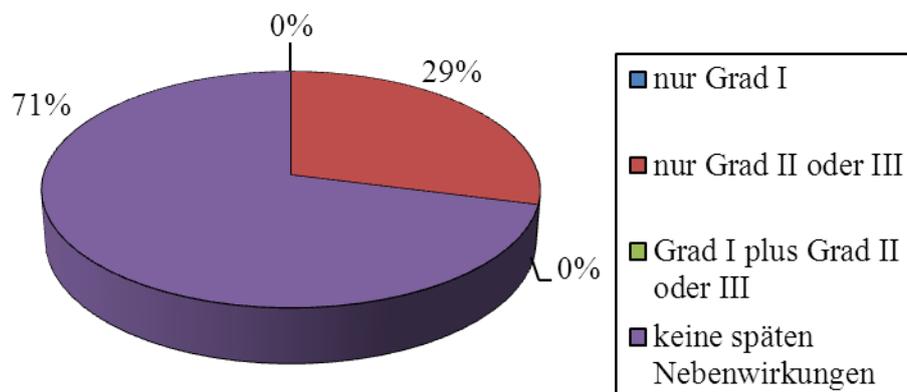


Abbildung 29

Relative Häufigkeiten der späten Nebenwirkungen verschiedener Grade an Harnblase und Darm bei Patienten, die mit anderen Bestrahlungstechniken* behandelt wurden.

* HDR+IMRT, HDR+4-Felder, HDR+5-Felder, IMRT, LDR, 4-Felder, 5-Felder

Des Weiteren erfolgte ein Vergleich des Verteilungsmusters der späten Nebenwirkungen an Harnblase oder Darm bei Patienten der Gruppe RapidArc (Abb.30), Patienten der Gruppe HDR + RapidArc (Abb.31) und Patienten mit anderen Bestrahlungstechniken* (Abb.32). In allen drei Gruppen wies die Hälfte der Patienten keine späten Nebenwirkungen auf. Auch die Verteilung von Zystitis und Proktitis stellte sich in allen drei Bestrahlungsgruppen mit 20 bis 30% der Patienten fast identisch dar.

Somit wird ersichtlich, dass unabhängig von der Bestrahlungstechnik, egal ob RapidArc oder HDR + RapidArc oder andere Bestrahlungstechniken*, kein signifikanter Unterschied zwischen dem Verteilungsmuster der späten Nebenwirkungen besteht und die Art der Bestrahlung keinen Einfluss auf dieses Muster hat.

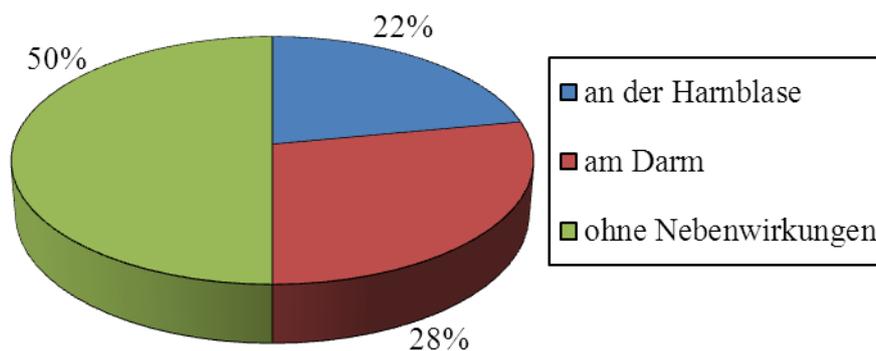


Abbildung 30

Relative Häufigkeiten der späten Nebenwirkungen der Patienten der Gruppe RapidArc.

* HDR+IMRT, HDR+4-Felder, HDR+5-Felder, IMRT, LDR, 4-Felder, 5-Felder

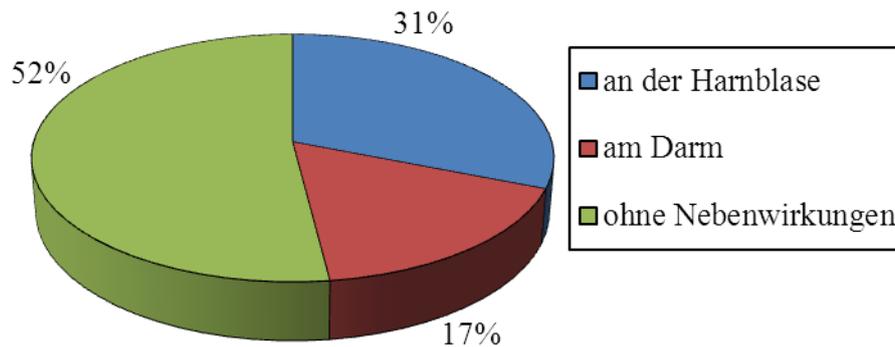


Abbildung 31

Relative Häufigkeiten der späten Nebenwirkungen bei den Patienten der Gruppe HDR + RapidArc.

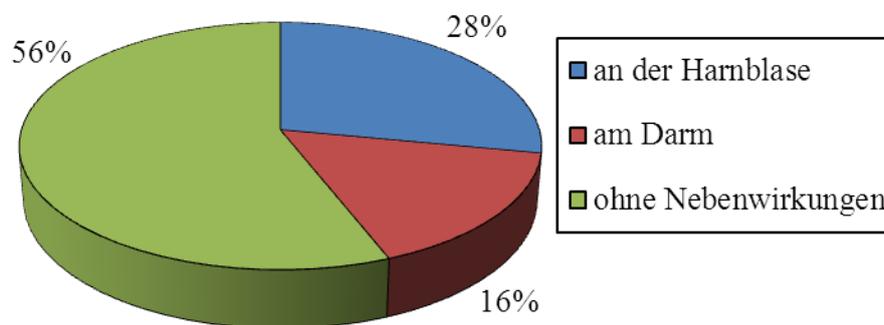


Abbildung 32

Relative Häufigkeiten der späten Nebenwirkungen bei den Patienten mit anderen Bestrahlungstechniken*.

* HDR+IMRT, HDR+4-Felder, HDR+5-Felder, IMRT, LDR, 4-Felder, 5-Felder

Einfluss des Alters auf die Nebenwirkungen der Strahlentherapie

Insgesamt traten bei den akuten und späten Nebenwirkungen an der Blase und am Darm bei den Patienten im Alter von 51 bis 84 Jahren keine Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeiten der verschiedenen Grade und der Organverteilung bezüglich der Nebenwirkungen auf. Sowohl die „jüngeren“ als auch die „älteren“ Studienteilnehmer wiesen jeweils akute und späte Nebenwirkungen I. bis III. Grades auf. Daraus lässt sich schließen, dass das Alter auf die Nebenwirkungen keinen großen Einfluss hat.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Chromosomenaberrationen in Lymphozyten von Prostatakrebspatienten jeweils vor Beginn der Therapie sowie 1 und 2 Jahre nach Ende der Strahlentherapie untersucht. Dazu wurden die Lymphozyten stimuliert, kultiviert, aufgearbeitet und mikroskopisch in der Metaphase ausgewertet. Die Patienten wurden anhand ihrer Bestrahlungstechnik in verschiedene Gruppen unterteilt. Zusätzlich wurden retrospektiv Daten über Nebenwirkungen der Strahlentherapie und mögliche Belastungsfaktoren der Patienten erhoben.

Die mikroskopische Untersuchung der Lymphozyten erfolgte mit Hilfe der 3-Farben-FISH-Färbung für die Chromosomen 1, 2 und 4. Die Anzahl der ausgewerteten chromosomalen Aberrationen wird hierbei allerdings unterschätzt, da nur 3 Chromosomen (circa 22,5% des Genoms) repräsentativ ausgewertet wurden und die restlichen Chromosomen nicht separat angefärbt wurden. Eine 24-Farben-FISH-Färbung und somit spezifische Anfärbung aller Chromosomen einer Zelle war bei der Auswertung von jeweils 500 Zellen pro Patient vor Beginn der Therapie und jeweils 300 Zellen pro Patient 1 und 2 Jahre nach Ende der Therapie wegen des zu großen Zeitaufwandes nicht möglich. Die genomischen (gesamten) chromosomalen Aberrationsraten sind also höher als die in dieser Arbeit ermittelten partiellen Raten der einfachen Austauschaberrationen $y_{S.E.}$.

Bei fast allen Patienten war die Aberrationsrate $y_{S.E.}$ der Blutproben 1 Jahr nach Therapieende im Vergleich zum Kontrollwert vor Beginn der Therapie signifikant erhöht. Bei 3 Patienten (PA 34, PA 43, PA 44) war die chromosomale Aberrationsrate nach 1 Jahr nicht signifikant erhöht. Allerdings weisen diese 3 Patienten bereits sehr hohe Spontanwerte auf. Möglicherweise ist auf Grund der Verwendung der 3-Farben-FISH-Färbung eine weitere Erhöhung der Aberrationsrate durch die Radiotherapie in Form von komplexen Austauschaberrationen nicht nachweisbar, da die restlichen Chromosomen nicht angefärbt wurden. Somit wäre die Aberrationsrate vor allem nach der Radiotherapie unterschätzt.

Multiple chromosomale Austauschaberrationen traten bei 85% der Patientenproben 1 Jahr nach Ende der Radiotherapie auf. Im Vergleich dazu waren bei 29% der Kontrollproben vor

Beginn der Therapie multiple Austauschaberrationen zu beobachten. Auch 2 Jahre nach Therapieende ist die Anzahl der multiplen Austauschaberrationen noch nicht gesunken. Die Rate liegt nach 2 Jahren weiterhin bei 84%. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass vor allem bei den Patientenproben, in denen mehrere betroffene Zellen vorhanden sind, chromosomale Instabilitäten in den Stammzellen der Patienten vorliegen, sodass auch nach einem längerem Zeitraum noch Lymphozyten mit Chromosomenschäden nachgebildet werden.

In 10% der Patientenproben waren vor der Therapie komplexe chromosomale Austauschaberrationen vorhanden. 1 Jahr nach Ende der Therapie hat sich die Anzahl der komplexen Aberrationen vervierfacht (44%). Auch 2 Jahre nach Therapieende sank die Rate nur leicht auf 32% ab. Auch dieses Ergebnis ist vermutlich auf chromosomale Instabilität in den Stammzellen der betroffenen Patienten zurückzuführen.

Die Anzahl der aneuploiden Zellen hat sich im Vergleich zu den Kontrollwerten vor Therapiebeginn (9%) 1 Jahr nach Ende der Therapie verdreifacht (33%). 2 Jahre nach Therapieende ist die Anzahl der Patienten mit aneuploiden Zellen jedoch wieder auf 5% gesunken. Hierbei lässt sich vermuten, dass in den Zellen mit aneuploidem Chromosomensatz schneller die Apoptose eingeleitet wird, sodass nach 2 Jahren fast alle aneuploiden Zellen wieder verschwunden sind.

In den Abb. 33 und Abb. 34 sind die $y_{S.E.}$ -Werte nach der Bestrahlungstechnik des Patienten geordnet aufgetragen: RapidArc oder HDR + RapidArc, jeweils zum Zeitpunkt der Blutentnahme vor Beginn der Therapie und 1 Jahr nach Ende der Radiotherapie. Bei beiden Bestrahlungstechniken sind Patienten mit höheren und niedrigeren chromosomalen Aberrationsraten $y_{S.E.}$ 1 Jahr nach Therapieende vorhanden. Es scheint jedoch, dass bei den Patienten der RapidArc-Gruppe trendmäßig höhere Aberrationsraten nach 1 Jahr vorliegen. Die Ursache dafür könnte sein, dass bei der alleinigen Bestrahlung mittels RapidArc im Vergleich zur HDR + RapidArc-Radiotherapie das Knochenmark einer höheren Strahlendosis ausgesetzt ist. Durch diese Bestrahlung werden chromosomale Aberrationen hervorgerufen, die auch noch 1 Jahr nach Therapieende in den peripheren Lymphozyten nachweisbar sind.

Da die Anzahl der Studienteilnehmer mit RapidArc-Strahlentherapie allerdings gering ist, sind weitere Studien mit höherer Patientenzahl erforderlich, um eine exaktere Aussage darüber treffen zu können.

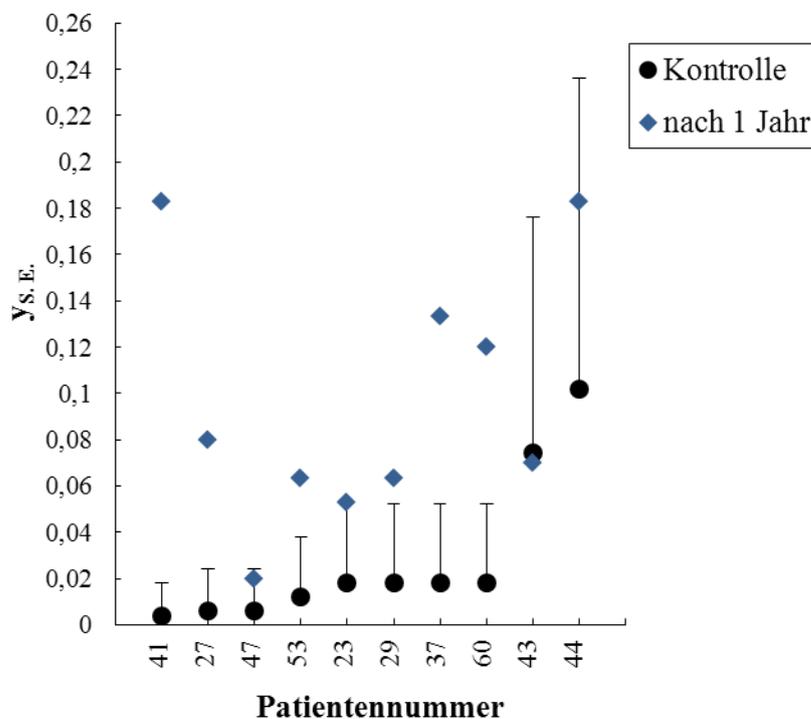


Abbildung 33

Einfache chromosomale Austauschaberrationsraten $y_{S.E.}$ in den unbestrahlten Blutproben vor Beginn der Therapie (●) und 1 Jahr nach Ende der Therapie (◆) bei Patienten der Gruppe RapidArc, nach aufsteigendem $y_{S.E.}$ -Kontrollwert geordnet. Die vertikalen Balken \top repräsentieren die 95%-Poisson-Vertrauensbereiche, welche auf Grund der Übersichtlichkeit nur für die unbestrahlten Kontrollproben dargestellt sind.

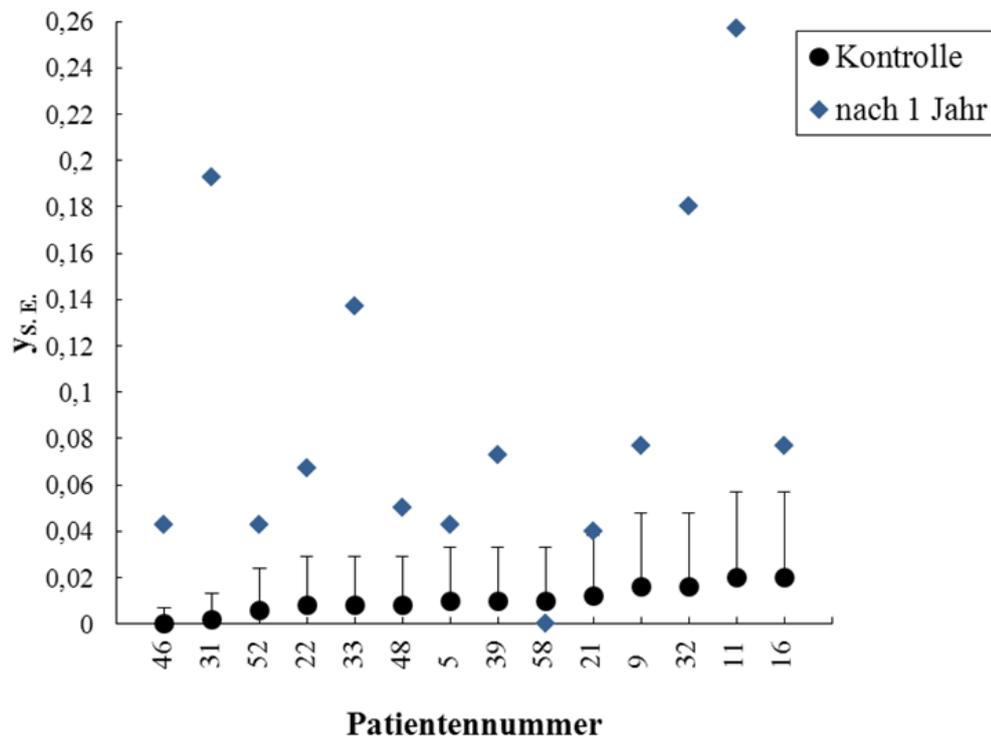


Abbildung 34

Einfache chromosomale Austauschaberrationsraten $y_{S,E}$ in den unbestrahlten Blutproben vor Beginn der Therapie (●) und 1 Jahr nach Ende der Therapie (◆) bei Patienten der Gruppe HDR + RapidArc, nach aufsteigendem $y_{S,E}$ -Kontrollwert geordnet. Die vertikalen Balken \mp repräsentieren die 95%-Poisson-Vertrauensbereiche, welche auf Grund der Übersichtlichkeit nur für die unbestrahlten Kontrollproben dargestellt sind.

Unter den akuten Nebenwirkungen an Harnblase und/ oder Darm litten circa 90% aller Patienten unabhängig davon, welche Bestrahlungstechnik angewendet wurde. Es hat sich gezeigt, dass es keinen Unterschied im Ausmaß der Akutnebenwirkungen zwischen RapidArc, HDR + RapidArc und den anderen Bestrahlungstechniken gibt. Bei circa 30% der Patienten traten späte Nebenwirkungen an Harnblase und/ oder Darm auf. Hier fällt allerdings auf, dass bei den Patienten der Gruppen RapidArc oder HDR + RapidArc überwiegend leichte Nebenwirkungen I. Grades auftraten, während die Patienten der anderen Bestrahlungstechniken* vorwiegend unter schweren Nebenwirkungen II. oder III. Grades litten.

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen den schweren Nebenwirkungen II. oder III. Grades und der entsprechenden chromosomalen Aberrationsrate in den Lymphozyten der Patienten besteht. Hierzu wurden die spontanen Chromosomenaberrationsraten (vor Therapiebeginn) sowie die entsprechenden $y_{S.E.}$ -Werte für 1 und 2 Jahre nach Therapieende in jeweils eine Gruppe mit hohen und eine Gruppe mit niedrigen $y_{S.E.}$ -Werten aufgeteilt. Die Gruppeneinteilung erfolgte wie bereits in 3.3. anhand des oberen 95%-Vertrauensbereiches des Median, d. h. Patienten mit $y_{S.E.}$ -Werten oberhalb des 95%-Vertrauensbereiches des Median wurden der Gruppe der höheren Aberrationsraten zugeteilt und die Patienten mit $y_{S.E.}$ -Werten unterhalb des 95%-Vertrauensbereiches des Median der Gruppe der niedrigeren Aberrationsraten.

Sowohl 37% der Patienten der Gruppe mit höheren spontanen Aberrationsraten als auch 31% der Patienten mit niedrigen spontanen Aberrationsraten zeigten Nebenwirkungen II. oder III. Grades. Somit liegt keine Korrelation zwischen den $y_{S.E.}$ -Werten und dem Ausmaß der Nebenwirkungen vor. Allerdings ist ein Trend erkennbar zur Gruppe der höheren $y_{S.E.}$ -Werte. Um eine genaue Aussage über die Korrelation zu treffen, müssten in einer neuen Studie wesentlich mehr Patienten untersucht werden.

* HDR+IMRT, HDR+4-Felder, HDR+5-Felder, IMRT, LDR, 4-Felder, 5-Felder

1 Jahr nach Therapieende unterscheidet sich die Gruppe mit höheren Aberrationsraten mit 27% nicht wesentlich von der Gruppe der niedrigeren Aberrationsraten mit 44% Nebenwirkungen II. oder III. Grades. Auch bei den Werten 1 Jahr nach Ende der Therapie ist lediglich ein Trend in Richtung der niedrigeren $y_{S.E.}$ -Werte erkennbar. Für eine genauere Aussage werden ebenfalls mehr Patienten benötigt.

Bei den $y_{S.E.}$ -Werten 2 Jahre nach Therapieende ist auffallend, dass 100% der Patienten der Gruppe mit den höheren Aberrationsraten schwere Nebenwirkungen hatten und im Vergleich dazu nur 38% der Gruppe mit den niedrigeren Aberrationsraten. Da die Gruppe mit den höheren Aberrationsraten lediglich aus 3 Patienten besteht, lässt sich keine zuverlässige statistische Aussage treffen. Auch hierfür müssten mehr Patientendaten zur Verfügung stehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in dieser Studie erste wichtige Trends bezüglich des Zusammenhanges zwischen Nebenwirkungen II. bis III. Grades und dem Ausmaß der chromosomalen Aberrationsraten angedeutet haben. Aus diesem Grund wäre es sicherlich sinnvoll, diesen Aspekt in einer Studie mit deutlich größerem Patientenkollektiv genauer zu untersuchen. Es wäre zu erwarten, dass die Patienten, bei denen genetisch bedingt insgesamt schlechtere Reparaturmechanismen für DNA-Doppelstrangbrüche vorhanden sind, eine schlechtere Reparatur der Schäden des Normalgewebes durchgeführt wird. Somit würden bei diesen Patienten mehr toxische Strahlenwirkungen nach der Radiotherapie auftreten.

Auf Grund der aktuellen Ergebnisse dieser Arbeit kann zur Prädiktion der Nebenwirkungen die chromosomale Aberrationsrate noch nicht in Betracht gezogen werden, sondern müsste in einer größeren Studie genauer untersucht werden.

Auch in anderen Studien wurde bereits versucht, prädiktive Größen für die Risikoeinschätzung der Entwicklung von Nebenwirkungen durch die Radiotherapie zu erkennen. Lisowska et al. untersuchten in ihrer Studie die Lymphozyten von Patienten mit Larynxkarzinom vor der Radiotherapie, um eine eventuelle Korrelation zwischen den chromosomalen Aberrationsraten und den Nebenwirkungen der Strahlentherapie zu entdecken. Dafür kultivierten und bestrahlten sie *in vitro* zum einen Lymphozyten von Larynxkarzinompatienten vor Radiotherapie und zum anderen Lymphozyten von gesunden

Probanden. Dabei stellte sich heraus, dass die spontanen und radioinduzierten chromosomalen Aberrationsraten der Patienten mit Larynxkarzinom durchschnittlich höher waren, als bei den gesunden Probanden. Auch Lisowska et al. entdeckten in ihrer Studie keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Nebenwirkungen und der chromosomalen Aberrationsrate der Patienten mit Larynxkarzinom. Dennoch könnte die chromosomale Radiosensitivität in den Lymphozyten ein prädisponierender Marker für die Entstehung von Larynxkarzinomen sein (Lisowska et al. 2006).

Die Tatsache, dass Lisowska et al. in ihrer Studie keine statistisch signifikante Korrelation bezüglich der Nebenwirkungen und der chromosomalen Aberrationsrate bei Patienten mit Larynxkarzinomen entdeckten, stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit für das Prostatakarzinom überein.

Ein anderer Ansatzpunkt auf der Suche nach prädiktiven Faktoren für die Radiosensitivität ist die Mikronukleus-Induktion in Lymphozyten. T. Waldeyer analysierte in ihrer Studie die Lymphozyten, vor allem von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren vor Beginn der Strahlentherapie sowie nach in vitro Bestrahlung. Es zeigte sich, dass die Patienten mit vielen Nebenwirkungen signifikant höhere Mikronuklei-Werte aufwiesen als die Proben der Patienten mit weniger Nebenwirkungen. Somit kann der direkte Mikronuklei-Wert als prädiktiver Faktor für strahlensensible Patienten anerkannt werden (T. Waldeyer, 2006).

A.-C. Müller beschäftigte sich in seiner Studie mit der Untersuchung des Comet Assay als prädiktives Verfahren zur Testung der individuellen Strahlensensibilität bei gesunden Probanden und Patienten mit Rektumkarzinom. Zusätzlich führte er die Testung des Stoffes Amifostin auf Radioprotektion durch. Hierfür entnahm er mehrmals Blut von den gesunden Probanden. Bei den Patienten mit Rektumkarzinom erfolgten die Blutentnahmen jeweils vor und nach Amifostingabe und zwar vor Beginn der Radiotherapie. Die Lymphozyten wurden aufgearbeitet, in vitro bestrahlt und anschließend mittels Comet Assay untersucht. Müller stellte fest, dass Amifostin nur in durch alkalische Phosphatase aktiviertem Zustand radioprotektiv wirkt und der Comet Assay als prädiktiver Test für die individuelle Strahlensensibilität klinisch sinnvoll eingesetzt werden könnte (A.-C. Müller, 2004).

Pederson et al. untersuchten in ihrer Studie die späten urogenitalen und gastrointestinalen Nebenwirkungen in Patienten mit Adenokarzinom der Prostata nach IMRT-Radiotherapie. Sie

analysierten die Daten von 296 erkrankten Männern, die mit einer medianen Dosis von 76 Gy bestrahlt wurden. 150 dieser Patienten erhielten zusätzlich zur Strahlentherapie eine Androgen-Deprivationstherapie über eine mediane Zeit von 4 Monaten. Die Einteilung der späten Nebenwirkungen erfolgte anhand der *Common Toxicity Criteria Version 3.0*. Zusätzlich teilten sie die Patienten in Gruppen mit verschiedenem Dosis-Volumen an Blase und Rektum ein (70 Gy, 65 Gy, 40 Gy). Die beobachteten Nebenwirkungen entsprachen maximal Grad II+.

Nach 4 Jahren litten noch 19% der Patienten an urogenitalen und 9% an gastrointestinalen Nebenwirkungen maximal Grad II+. Pederson et al. stellten fest, dass mit der Dosis der Radiotherapie sowie mit der Bestrahlung des gesamten Beckens und mit der Durchführung der Androgen-Deprivationstherapie urogenitale Nebenwirkungen assoziiert waren. Bei Patienten mit einer Dosis <76 Gy litten nach 4 Jahren nur 13% unter urogenitalen Nebenwirkungen maximal Grad II+, während 24% der Patienten mit einer Dosis >76 Gy noch an urogenitalen Spätnebenwirkungen litten. Die Patienten mit Bestrahlung des gesamten Beckens hatten mehr urogenitale Spätnebenwirkungen (36%) als die Patienten, bei denen nur die Prostata radiotherapiert wurde (17%). Auch die Patienten mit zusätzlicher Androgen-Deprivationstherapie zeigten mehr urogenitale Spätnebenwirkungen (25%) als die Patienten mit alleiniger Strahlentherapie (13%).

Die gastrointestinalen Nebenwirkungen maximal Grad II+ waren mit dem Alter der Patienten und der gleichzeitigen Durchführung einer Antikoagulation assoziiert. Patienten unter gleichzeitiger Antikoagulation litten häufiger unter gastrointestinalen Spätnebenwirkungen (27%) als die Patienten ohne (8%).

Pederson et al. ziehen die Schlussfolgerung, dass die IMRT eine niedrige Rate an gastrointestinalen und urogenitalen Spätnebenwirkungen zur Folge hat und dass die Absenkung der rektalen Strahlendosis spätere gastrointestinale Nebenwirkungen minimieren kann (Pederson et al. 2012).

Akimoto et al. untersuchten in ihrer Studie die akute urogenitale Toxizität bei Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom nach Durchführung einer HDR-Brachytherapie in Kombination mit perkutaner Bestrahlung. Zusätzlich analysierten sie den Zusammenhang zwischen der Strahlendosis, mit der die Urethra bestrahlt wurde und der Schwere der akuten urogenitalen Nebenwirkungen. Dazu untersuchten sie Patienten, welche eine perkutane

Radiotherapie von 51 Gy (pro Fraktion 3 Gy, 3 mal pro Woche) mittels 4-Felder-Technik erhielten und im Anschluss daran die HDR-Brachytherapie mit unterschiedlicher Anzahl und Dosis der Einzelfraktionierungen (5 Gy, 7 Gy, 9 Gy pro Fraktion, 2 mal pro Tag) durchgeführt wurde. Alle Patienten bekamen zusätzlich eine Androgen-Ablation. Die Nachsorge der Patienten erfolgte nach einer medianen Zeit von 14 Monaten. Die Einteilung der Toxizitätsgrade erfolgte anhand der Klassifikation nach RTOG/EORTC. Als Hauptsymptome wurden die Dysurie, Pollakisurie und Nykturie analysiert.

Akimoto et al. stellten fest, dass es zwischen den Gruppen mit unterschiedlicher HDR-Einzelfraktionierung keine signifikanten Unterschiede im Ausmaß der akuten urogenitalen Nebenwirkungen gab. Insgesamt litten 56% der Patienten unter akuten urogenitalen Nebenwirkungen Grad 0 bis I und 44% unter Nebenwirkungen Grad II bis IV. Des Weiteren zeigte sich, dass Patienten mit 11 oder weniger HDR-Implantationsnadeln eine signifikant höhere Anzahl an Nebenwirkungen Grad II bis IV hatten, im Vergleich zu den Patienten mit 12 oder mehr HDR-Implantationsnadeln.

Akimoto et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die Dosiserhöhung der Einzelfraktionierung oder die Reduzierung der Anzahl der Einzelfraktionierungen der HDR-Brachytherapie die Schwere der akuten urogenitalen Toxizität nicht beeinflusst. Nur das bestrahlte Volumen der Urethra ist eng mit dem Ausmaß der akuten urogenitalen Nebenwirkungen verbunden (Akimoto et al. 2005).

Das Resultat der Studie von Akimoto et al. ist vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in der 55% der Patienten der Gruppe mit HDR + RapidArc oder alleiniger RapidArc-Bestrahlung akute Nebenwirkungen Grad 0 bis I und 45% Nebenwirkungen Grad II bis IV an Harnblase und Darm aufwiesen.

Auch wenn in dieser Arbeit kein direkter Zusammenhang zwischen den Nebenwirkungen und der chromosomalen Austauschaberrationsrate gefunden wurde, spielen die chromosomalen Schäden eine wichtige Rolle in der Radiotherapie von Tumorerkrankungen. In dieser Arbeit wurde im Vorfeld angenommen, dass die $y_{S.E.}$ -Werte 1 und 2 Jahre nach Therapieende im Vergleich zu den Kontrollwerten vor der Therapie nicht mehr signifikant erhöht werden. Mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtests zeigte sich allerdings, dass sowohl die $y_{S.E.}$ -Werte 1 Jahr als auch 2 Jahre nach Therapieende im Vergleich zu den Kontrollwerten vor Therapiebeginn signifikant erhöht blieben.

Auch Hille et al. untersuchten in ihrer Studie spontane und strahleninduzierte einfache Chromosomenaberrationen $y_{S.E.}$ in Lymphozyten von Prostatakrebspatienten. Es wurden von 102 Prostatakarzinompatienten Blutproben vor der Radiotherapie entnommen. 10 dieser Patienten wurden zu einer Untergruppe zusammengefasst, der eine Vergleichsgruppe von 10 gesunden Probanden gegenüberstand. Bei diesen Patienten wurden jeweils die spontanen einfachen chromosomalen Austauschaberrationen $y_{S.E.}$ der Chromosomen 2 und 4 vor Beginn der Strahlentherapie mittels FISH-Färbung ausgewertet. Die Patienten mit Prostatakarzinom wiesen eine höhere spontane Aberrationsrate auf als die gesunden Probanden. Von den 10 Prostatakarzinompatienten wurden weiterhin Blutproben während, am Ende und 1 Jahr nach Ende der Therapie entnommen und mittels FISH auf einfache chromosomale Austauschaberrationen untersucht. Die Aberrationsraten waren zwar während der Therapie, am Ende und nach der Therapie erhöht. Allerdings waren die Aberrationsraten am Ende der Therapie und 1 Jahr nach der Therapie nicht signifikant erhöht (Hille et al. 2010).

Die Resultate der Studie von Hille et al. stimmen teilweise überein mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Die in dieser Dissertation signifikant erhöhten $y_{S.E.}$ -Werte 1 Jahr nach Therapieende weisen auf eine chromosomale Instabilität (auf Grund mangelnder Reparaturmechanismen für strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche) hin. Die Tatsache, dass die Aberrationsraten 2 Jahre nach Therapieende noch immer signifikant erhöht sind im Vergleich zu den Kontrollwerten vor der Therapie, aber die Aberrationsraten nach 2 Jahren nicht signifikant erhöht sind im Vergleich mit denen 1 Jahr nach der Therapie, deutet darauf hin, dass die Ursache der chromosomalen Instabilität nicht von suboptimalen zellulären Reparaturmechanismen ausgeht, sondern von einer übergeordneten Ebene. Die tatsächliche Ursache für die konstante Höhe der Aberrationsraten 1 und 2 Jahre nach Therapieende könnten vermutlich strahleninduzierte Veränderungen in den Stammzellen im Knochenmark sein, sodass die Lymphozyten bereits mit Chromosomenschäden im Knochenmark gebildet und dann in die Peripherie des Körpers ausgeschwemmt werden.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Chromosomen in den Lymphozyten von Patienten mit Prostatakrebs vor Beginn der Radiotherapie sowie 1 und 2 Jahre nach Beendigung der Radiotherapie untersucht. Die Patienten wurden entsprechend ihrer unterschiedlichen Bestrahlungsregime in 4 Gruppen eingeteilt. Es erfolgte die mikroskopische Analyse der Chromosomen in Bezug auf einzelne, komplexe und multiple Austauschaberrationen sowie auf aneuploide Zellen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Chromosomenaberrationsraten bei den unterschiedlichen Strahlentherapie-Modalitäten mittels FISH-Färbung zu untersuchen und zu vergleichen sowie retrospektiv eine mögliche Korrelation zwischen den Aberrationsraten und den beobachteten Nebenwirkungen der einzelnen Bestrahlungsregime zu analysieren. Zusätzlich wurde ein möglicher Einfluss der familiären und beruflichen Belastungsfaktoren der Patienten sowie des Patientenalters und des Tumorstaging auf die chromosomalen Aberrationsraten untersucht.

Unter Verwendung verschiedener statistischer Tests konnte gezeigt werden, dass die chromosomalen Aberrationsraten y_{S-E} in den Lymphozyten zum Zeitpunkt 1 und 2 Jahre nach Ende der Therapie im Vergleich zu den Aberrationsraten vor Therapie signifikant erhöht waren. Die Aberrationsraten in den Proben 1 und 2 Jahre nach Ende der Therapie im Vergleich zueinander sind nicht signifikant unterschiedlich. Auch 2 Jahre nach der Therapie wurde also kein Absinken der Aberrationsraten auf das Spontanniveau beobachtet.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass sich sowohl 1 als auch 2 Jahre nach Therapieende die Anzahl der Patienten mit multiplen Austauschaberrationen fast verdreifacht hat. Dies könnte ein Hinweis auf eine strahleninduzierte genomische Instabilität in den bestrahlten und sich später teilenden Knochenmarksstammzellen sein, da die mittlere Lebensdauer der während der Therapie bestrahlten Lymphozyten nur etwa 110 Tage beträgt.

Das Alter der Patienten sowie das Tumorstaging des Prostatakarzinoms vor Beginn der Radiotherapie hatten keinen Einfluss auf die Aberrationsraten.

Durch die Patientenanamnese erfasste berufliche Schadstoffexposition zeigte, dass ein Großteil der Patienten (65%) mit Prostatakarzinom beruflich schadstoffexponiert war.

Bei 40% der beruflich schadstoffexponierten Patienten lagen zusätzlich noch die Risikofaktoren der positiven Familienanamnese für Krebserkrankungen sowie ein positiver Nikotinstatus vor.

Insgesamt 92% der Patienten wiesen, unabhängig von der Bestrahlungstechnik, akute Nebenwirkungen an Harnblase, Darm oder an beiden Organen auf. Im Vergleich dazu traten bei 34% der Patienten auch späte Nebenwirkungen an Harnblase, Darm oder an beiden Organen auf. Sowohl die Patienten der Bestrahlungsgruppe RapidArc und HDR + RapidArc als auch die Patienten mit den anderen Bestrahlungsregimen wiesen nur in circa 30% der Fälle Spätnebenwirkungen auf. Die Patienten, welche mit RapidArc oder HDR + RapidArc bestrahlt wurden, bekamen allerdings deutlich mildere Spätnebenwirkungen im Vergleich zu den Patienten mit den anderen Bestrahlungsregimen.

Das Alter der Patienten hatte keinen Einfluss auf das Ausmaß der akuten und späten Nebenwirkungen.

6. Anhang

6.1. Patienteninformation

Georg-August-Universität Göttingen

Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. C. F. Hess

Patienteninformation zur wissenschaftlichen Studie:
Genetisch determinierte Strahlen-Normalgewebsempfindlichkeit

Patientenaufkleber/Patientencode

Sehr geehrter Patient!

Bitte lesen Sie den folgenden Text als Vorinformation für unser Gespräch sorgfältig durch und fragen Sie uns bei Unklarheiten während des Gespräches.

Aufgrund eines bösartigen Tumors der Prostata (Prostatakarzinom) ist bei Ihnen die Durchführung einer Strahlentherapie des Beckens/ der Prostata erforderlich. Dadurch kann es u.a. zu akuten und späten Nebenwirkungen am Enddarm und Dünndarm kommen. Die genauen Ursachen für das Auftreten dieser Nebenwirkungen sind noch nicht bekannt. Ein zuverlässiges Erkennen der Ursachen könnte in der Zukunft eine individuelle Anpassung der Strahlentherapie und damit eine Verminderung von Nebenwirkungen und/ oder eine höhere Heilungsrate ermöglichen.

Das Ziel dieser wissenschaftlichen Studie ist festzustellen, ob das Auftreten und die Stärke der Nebenwirkungen, sowie der therapeutische Erfolg der Behandlung im Zusammenhang steht mit der normalen, angeborenen Variabilität der Träger der Erbinformation (DNS). Wir interessieren uns hier für Genvarianten, die häufig in der Allgemeinbevölkerung vorkommen, so genannte Polymorphismen.

Zur Feststellung der klinischen Nebenwirkungen wird während der Strahlentherapie (1x in der Woche), zum Therapieabschluss, 2 Wochen nach Therapieende und danach 1x jährlich eine klinische Untersuchung durchgeführt, wobei der Grad der aufgetretenen Nebenwirkungen genau aufgezeichnet wird. Einige Parameter, die einen Hinweis auf Strahlenwirkungen geben können, wollen wir im Urin messen. Dazu würden lediglich Urinproben vor und während der Strahlenbehandlung gesammelt. Für die Bestimmung von Polymorphismen der DNS und für weitere funktionelle Messungen sind Blutzellen erforderlich. Dazu werden vor Beginn der Strahlentherapie, während der Strahlentherapie und nach Beendigung der Strahlentherapie Blutentnahmen durchgeführt. Da zu diesen Zeitpunkten ohnehin Blut für klinische Kontrolluntersuchungen entnommen werden muss, kommt es nicht zu zusätzlichen Blutentnahmen. Es wird lediglich pro Abnahmetag ca. 20-30 ml Blut zusätzlich benötigt, verglichen mit einer Blutspende eine geringe Menge.

Die regulären Blutentnahmen dienen der Kontrolle der Zusammensetzung des Blutes (Anzahl roter und weißer Blutkörperchen, Blutplättchen und Salzzusammensetzungen im Blut) und des Wertes, der einen Zusammenhang mit dem bösartigen Prostataumor hat (PSA-Wert).

Für wissenschaftliche Zwecke im Rahmen der Studie wird die Blutprobe aufgeteilt. Ein Teil Ihrer codierten Blutprobe wird für funktionelle Messungen biologischer Reaktionen von Blutzellen auf Bestrahlung verwendet. Daraus entstehen für Sie keine zusätzlichen Risiken, da diese Untersuchungen alle außerhalb des Körpers erfolgen. Die DNS-Polymorphismen sollen ebenfalls in einer der entnommenen Blutproben bestimmt werden. Dafür werden wir nur solche Bereiche des menschlichen Genoms und deren Produkte auswählen, für die wir einen Zusammenhang mit Strahlennebenwirkungen vermuten, so etwa für die DNS-Reparaturfähigkeit, für die Produktion und Verarbeitung reaktiver Sauerstoffverbindungen und für Wachstumsfaktoren (Zytokine). Da nicht alle wissenschaftlichen Untersuchungen zeitgleich durchgeführt werden können, müssen Proben Ihrer DNS und Ihres Blutplasmas eingelagert werden. Sollten sich aus den durchgeführten Untersuchungen neue Fragestellungen ergeben, so würden Ihre verschlüsselten Daten und DNS-Proben an weitere Wissenschaftler weitergegeben werden, die weitergehende Untersuchungen zur

Strahlenempfindlichkeit oder zur Entstehungsweise von Prostatakarzinomen durchführen können.

Eine Weitergabe Ihrer genetischen Daten an Sie ist nicht vorgesehen.

Ihr genetisches Material und daraus erhobene Daten werden entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen für die Durchführung klinischer Studien aufbewahrt, das sind nach aktueller Gesetzgebung 15 Jahre nach Beendigung der klinischen Untersuchung. Dann werden Material und Daten vernichtet. Sie können jederzeit die Vernichtung des von Ihnen gewonnenen genetischen Materials und der daraus gewonnenen Daten verlangen – aus technischen Gründen mit der Ausnahme von Daten auf ROM-Speichermedien (ROM = Read only Memory), z. B. CD-ROMs, wie sie üblicherweise für Datensicherungen eingesetzt werden.

Eine gewerbliche Nutzung Ihrer genetischen Daten ist nicht vorgesehen. Sollten sich in der Zukunft Möglichkeiten einer wirtschaftlichen Verwertung aus der Analyse Ihrer genetischen Daten bei uns ergeben, ist eine Beteiligung Ihrerseits daran ausgeschlossen. Zusätzlich sind regelmäßig Stuhlprobenentnahmen, die auf bestimmte Entzündungsmarker hin untersucht werden sollen, erforderlich. Damit kann möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Markermenge im Stuhl und den Symptomen einer akuten Proktitis hergestellt werden. Zusätzlich lässt sich möglicherweise eine Korrelation mit chronischen Proktitissymptomen herstellen. Damit ergibt sich möglicherweise eine einfache, nichtinvasive Methode, um individuell die Entwicklung akuter radiotherapie-induzierter Proktitis monitoren zu können und möglicherweise sogar späte Nebenwirkungen vorhersagen zu können. Damit wird eine Möglichkeit zur Optimierung der Therapie eröffnet.

Die Teilnahme an dieser klinischen Prüfung ist freiwillig, es besteht ein Recht auf Nichtteilnahme ohne Nachteil für die Behandlung. Die Zustimmung kann jederzeit und ohne Angabe von Gründen widerrufen werden, ohne dass sich dieser Entschluss nachteilig auf die Behandlung durch den Arzt auswirkt.

6.2. Patienteneinverständniserklärung

Patienteneinverständniserklärung zur wissenschaftlichen Studie:
Genetisch determinierte Strahlen-Normalgewebsempfindlichkeit

Über das Ziel der Studie bin ich sowohl schriftlich als auch mündlich aufgeklärt worden und bin in Kenntnis dieser Information bereit, an der Studie teilzunehmen.

Ich habe den Aufklärungstext gelesen und verstanden. Ich hatte die Möglichkeit, Fragen zu stellen, und habe die Antworten verstanden und akzeptiere sie. Mein Arzt hat mich über die mit der Teilnahme an der Studie verbundenen Risiken und den möglichen Nutzen informiert. Es ist mir bewusst, dass ich selbst keinen Nutzen aus den Studienergebnissen gewinnen werde. Es ist auch nicht abzusehen, ob die Behandlung künftiger Patienten dadurch verbessert werden kann. Ich hatte ausreichend Zeit, mich zur Teilnahme an dieser Studie zu entscheiden und weiß, dass die Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Untersuchung freiwillig ist. Ich weiß, dass ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen diese Zustimmung widerrufen kann, ohne dass sich dieser Entschluss nachteilig auf die spätere Behandlung durch meinen Arzt auswirken wird.

Mir ist bekannt, dass Proben meines Erbgutes (DNS) und meines Blutplasmas gelagert sowie meine persönlichen Daten in verschlüsselter Form gespeichert werden. Sollte sich aus den durchgeführten Untersuchungen eine neue Fragestellung ergeben, so bin ich mit der Weitergabe meiner verschlüsselten Daten sowie meiner DNS-Proben an weitere Wissenschaftler einverstanden.

Ich habe eine Kopie der Patienteninformation und dieser Einwilligungserklärung erhalten. Ich erkläre hiermit meine freiwillige Teilnahme an dieser klinischen Studie.

Ort und Datum

Name/ Unterschrift des Patienten

Ort und Datum

Name/ Unterschrift des aufklärenden Arztes

7. Literaturverzeichnis

Adolfsson J (2008):

Watchful waiting and active surveillance: the current position. *BJU Int* 102(1): 10-4.

Akimoto T, Ito K, Saitoh J, Noda SE, Harashima K, Sakurai H, Nakayama Y, Yamamoto T, Suzuki K, Nakano T, Niibe H (2005):

Acute genitourinary toxicity after high-dose-rate (HDR) brachytherapy combined with hypofractionated external-beam radiation therapy for localized prostate cancer: correlation between the urethral dose in HDR brachytherapy and the severity of acute genitourinary toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63(2): 463-71.

American cancer society (2011):

Cancer facts and figures 2011: 4.

Bianco FJ, Scardino PT, Eastham JA (2005):

Radical prostatectomy: long-term cancer control and recovery of sexual and urinary function (“trifecta”). *Urology* 66(5): 83-94.

Briganti A, Larcher A, Abdollah F, Capitanio U, Gallina A, Suardi N, Bianchi M, Sun M, Freschi M, Salonia A, Karakiewicz PI, Rigatti P, Montorsi F (2012):

Updated Nomogram Predicting Lymph Node Invasion in Patients with Prostate Cancer Undergoing Extended Pelvic Lymph Node Dissection: The Essential Importance of Percentage of Positive Cores. *Eur Urol* 61(3): 480-7.

Brzozowska K, Pinkawa M, Eble MJ, Müller WU, Wojcik A, Kriehuber R, Schmitz S (2012):

In vivo versus in vitro individual radiosensitivity analysed in healthy donors and in prostate cancer patients with and without severe side effects after radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 88(5): 405-13.

Buselmaier W, Tariverdian G:

Humangenetik, 4. Auflage; Springer Medizinverlag, Heidelberg 2007: 123-74.

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(5): 1341-6.

European Association of Urology EAU (2012):

Guidelines on Prostate Cancer.: 8-162.

Edelbrock MA, Kaliyaperumal S, Williams KJ (2013):

Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. *Mutat Res.* 743-744: 54-66.

Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevad LL, ISUP Grading Committee (2005):

The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 29(9): 1228-42.

Ficarra V, Novara G, Artibani W, Cestari A, Galfano A, Graefen M, Guazzoni G,

Guillonneau B, Menon M, Montorsi F, Patel V, Rassweiler J, Van Poppel H (2009):

Retropubic, laparoscopic, and robot-assisted radical prostatectomy: a systematic review and cumulative analysis of comparative studies. *Eur Urol* 55(5): 1037-63.

Fogarty GB, Ng D, Liu G, Haydu LE, Bhandari N (2011):

Volumetric modulated arc therapy is superior to conventional intensity modulated radiotherapy--a comparison among prostate cancer patients treated in an Australian centre. *Radiat Oncol* 6: 108.

Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G (2008):

The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *Can J Urol* 15(1): 3866-71.

Henríquez-Hernández LA, Bordón E, Pinar B, Lloret M, Rodríguez-Gallego C, Lara PC (2012):

Prediction of normal tissue toxicity as part of the individualized treatment with radiotherapy in oncology patients. *Surg Oncol* 21(3): 201-6.

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(1): 27–37.

Humphrey P (2004):

Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol* 17: 292-306.

Jensen RB, Ozes A, Kim T, Estep A, Kowalczykowski SC (2013):

BRCA2 is epistatic to the RAD51 paralogs in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 12(4): 306-11.

Johns LE, Houlston RS (2003):

A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int* 91: 789-94.

Karahalil B, Bohr VA, Wilson DM (2012):

Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk. *Hum Exp Toxicol* 31(10): 981-1005.

- Karstens JH, Janssen S, Werner M, Meyer A, Bruns F, Meier K, Bremer M (2010):
Strahlentherapie und Radioonkologie aus interdisziplinärer Sicht, 5.Auflage;
Lehmanns Media, Berlin 2010: 33-37.
- Kavanagh JN, Redmond KM, Schettino G, Prise KM (2013):
DNA Double Strand Break Repair: A Radiation Perspective. *Antioxid Redox Signal*
18(18): 2458-72.
- Krebs in Deutschland 2007/2008:
Herausgegeben vom Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen
Krebsregister in Deutschland e.V., 8.Ausgabe, Berlin 2012: 80-83
- Lisowska H, Lankoff A, Wieczorek A, Florek A, Kuszewski T, Gózdź S, Wojcik A (2006):
Enhanced chromosomal radiosensitivity in peripheral blood lymphocytes of larynx
cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66(4): 1245-52.
- Lorimore SA, Mukherjee D, Robinson JI, Chrystal JA, Wright EG (2011):
Long-lived inflammatory signaling in irradiated bone marrow is genome dependent.
Cancer Res 71(20): 6485-91.
- Lucas JN, Awa A, Straume T, Poggensee M, Kodama Y, Nakano M, Ohtaki K, Weier HU,
Pinkel D, Gray J, et al. (1992):
Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing
radiation. *Int J Radiat Biol* 62(1): 53-63.
- Lu-Yao GL, Yao SL (1997):
Population-based study of long-term survival in patients with clinically localised
prostate cancer. *Lancet* 349(9056): 906-10.

Lu-Yao GL, Albertsen PC, Moore DF, Shih W, Lin Y, DiPaola RS, Barry MJ, Zietman A, O'Leary M, Walker-Corkery E, Yao SL (2009):

Outcomes of localized prostate cancer following conservative management. *JAMA* 302(11): 1202-9.

Malkova A, Haber JE (2012):

Mutations arising during repair of chromosome breaks. *Annu Rev Genet.* 46: 455-73.

Mukherjee D, Coates PJ, Lorimore SA, Wright EG (2012):

The in vivo expression of radiation-induced chromosomal instability has an inflammatory mechanism. *Radiat Res* 177(1): 18-24.

Parsons JL, Dianov GL (2013):

Co-ordination of base excision repair and genome stability. *DNA Repair Amst* 12: 326–33.

Pederson AW, Fricano J, Correa D, Pelizzari CA, Liauw SL (2012):

Late toxicity after intensity-modulated radiation therapy for localized prostate cancer: an exploration of dose-volume histogram parameters to limit genitourinary and gastrointestinal toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 82(1): 235-41.

Pesce GA, Clivio A, Cozzi L, Nicolini G, Richetti A, Salati E, Valli M, Vanetti E, Fogliata A (2011):

Early clinical experience of radiotherapy of prostate cancer with volumetric modulated arc therapy. *Radiat Oncol* 5: 54.

Trotti A, Byhardt R, Stetz J, Gwede C, Corn B, Fu K, Gunderson L, McCormick B, Morrisintegral M, Rich T, Shipley W, Curran W (2000):

Common toxicity criteria: version 2.0. an improved reference for grading the acute effects of cancer treatment: impact on radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 47(1): 13-47.

UICC International Union Against Cancer:

TNM Classification of Malignant Tumours. 7th ed., 2009

Waldeyer TR (2006):

Explorative Analyse zur Korrelation prädiktiver Testverfahren und der Ausprägung akuter und später Nebenwirkungen einer Strahlentherapie. Medizinische Dissertation Münster 2006.

Wang C, Lees-Miller SP (2013):

Detection and repair of ionizing radiation-induced DNA double strand breaks: new developments in nonhomologous end joining. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 86(3): 440-9.

Yang SH, Zhou R, Campbell J, Chen J, Ha T, Paull TT (2013):

The SOSS1 single-stranded DNA binding complex promotes DNA end resection in concert with Exo1. *EMBO J* 32(1): 126-39.

Yasui A (2013):

Alternative excision repair pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(6)

Zelefsky MJ, Levin EJ, Hunt M, Yamada Y, Shippy AM, Jackson A, Amols HI (2008):
Incidence of Late Rectal and Urinary Toxicities After Three-Dimensional Conformal
Radiotherapy and Intensity-Modulated Radiotherapy for Localized Prostate Cancer.
Int J Radiat Oncol Biol Phys 70(4): 1124-9.

Internetquellen:

(<http://www.strahlentherapie.med.uni-goettingen.de/html/technik/rapidarc.html>)

Danksagung

Herrn Professor Dr. rer. nat. Dr. med. C.-F. Hess danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der experimentellen Arbeiten in seiner Abteilung.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Frau Professor Dr. med. A. Hille für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie die freundliche Unterstützung in diversen technischen und methodischen Fragen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. rer. nat. Virsik-Köpp für die ausgezeichnete und stets freundliche Rundumbetreuung in Form von regelmäßigen Treffen zur Besprechung der aktuellen Ergebnisse, Planung des weiteren Vorgehens sowie fachlicher Beratung.

Des Weiteren möchte ich mich ebenfalls recht herzlich bei Frau Dipl. Biol. M. Rave-Fränk für die freundliche Betreuung im Bereich der Labortätigkeit bedanken.

Ebenfalls gilt mein herzlicher Dank den Medizin-Technischen-Assistentinnen des Labors der Abteilung Strahlentherapie, insbesondere Frau A. Bitter und Frau J. Kasten-Krapp, für die stetige freundliche und hilfreiche Unterstützung der Laborarbeit.