

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

**Experimentelle Untersuchungen zur Strahlenempfindlichkeit von
Lymphozyten bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Miriam Alice Frank
aus
Bruchsal

Göttingen 2016

Dekan:

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

Betreuungsausschuss

Betreuer:

PD Dr. med. Hendrik Wolff

Ko-Betreuerin:

PD Dr. med. dent. Sabine Sennhenn-Kirchner

Prüfungskommission

Referent:

PD Dr. med. Hendrik Wolff

Ko-Referentin:

PD Dr. med. dent. Sabine Sennhenn-Kirchner

Drittreferent:

Prof. Dr. med. dent. Rainer Mausberg

Datum der mündlichen Prüfung:

13.03.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Experimentelle Untersuchungen zur Strahlenempfindlichkeit von Lymphozyten bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Rektumkarzinom	1
1.1.1	Stadienadaptierte Behandlungsstrategien	2
1.2	Radio- und Chemotherapie.....	9
1.2.3	Effekte der Chemotherapie auf zellulärer Ebene.....	13
1.3	Diagnostik zytogenetischer Schäden.....	17
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit.....	20
2	Patienten, Material und Methoden	22
2.1	Patientenkollektiv und angewandte Therapie.....	22
2.2	Material	24
2.3	Methoden.....	27
2.3.1	Bestrahlungsplanung und Messung der PTV-Größe	27
2.3.2	Blutprobengewinnung.....	29
2.3.3	Aufarbeitung der Blutproben für den Mikronukleustest	31
2.3.4	Aufarbeitung der Blutproben zur 5-FU-Plasmaspiegelbestimmung	34
2.3.5	Lichtmikroskopische Auswertung der Lymphozytenpräparate.....	35
2.4	Statistik.....	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Mikronukleustest im Verlauf der Radiochemotherapie	40
3.1.1	Mikronuklei	40
3.1.2	Nukleoplasmabrücken	41
3.2	Einflussgrößen auf Variationen der Mikronukleustest-Ergebnisse.....	42
3.2.3	Effekt der Chemotherapiedosis.....	45
3.2.4	Effekt in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Chemotherapien.....	46
3.2.5	PTV.....	47
3.3	Akute Organtoxizität	48
3.3.1	Haut.....	48
3.3.2	Blase	49
3.3.3	Dünndarm	50
3.3.4	Enddarm.....	50
3.3.5	Gesamttoxizität im Überblick.....	51
3.3.6	Korrelation von Akuttoxizität und Ausbeute an Mikronuklei bzw. Nukleoplasmabrücken	52

4	Diskussion	53
4.1	Lymphozytendetektion mittels Mikronukleustest	53
4.2	Einflussvariablen auf die Ergebnisse des Mikronukleustests.....	53
4.2.1	Geschlecht und Alter	53
4.2.2	Chemotherapie-Dosis	56
4.2.3	Art der Chemotherapie und Vergleich des zytogenetischen Schadens in Therapiearm A und B	57
4.2.4	PTV-Größe	58
4.3	Zytogenetische Schäden und klinische Akuttoxizität bei neoadjuvanter Radiochemotherapie.....	61
4.4	Methodenkritik	64
4.5	Ausblick.....	65
5	Zusammenfassung	67
6	Anhang	69
7	Literaturverzeichnis.....	75

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1:	Chemische Struktur von 5-Fluorouracil	14
Abbildung 2:	Metabolische Bioaktivierung und Wirkungsmechanismus von 5-FU.....	16
Abbildung 3:	Chemische Struktur von Oxaliplatin	16
Abbildung 4:	Die wichtigsten Platin-DNA-Addukte innerhalb eines DNA-Stranges	17
Abbildung 5:	Skizze der an die Zytokinese-blockierten BNL gestellten Anforderungen....	37
Abbildung 6:	Beispiele für BNL.....	37
Abbildung 7:	Skizze, die die geforderten Bedingungen der MN erfüllt.....	37
Abbildung 8:	Zelluläre Gebilde, die MN ähneln, jedoch nicht als solche gewertet werden sollten	38
Abbildung 9:	Zytogenetischer Schaden (MN/BNL) in Abhängigkeit von der Strahlen- dosis.....	41
Abbildung 10:	Zytogenetischer Schaden (NPB/BNL) in Abhängigkeit von der Strahlen- dosis.....	42
Abbildung 11:	Gegenüberstellung des zytogenetischen Schadens (MN/BNL und NPB/BNL) von Männern und Frauen in Abhängigkeit von der Strahlendosis	43
Abbildung 12:	Zytogenetischer Schaden (MN/BNL und NPB/BNL) in Abhängigkeit vom Patientenalter.	44
Abbildung 13:	Zytogenetischer Schaden (MN/BNL und NPB/BNL) in Abhängigkeit von der 5-FU-Konzentration nach 50,4 Gy RCT	46
Abbildung 14:	Gegenüberstellung der 5-FU-Monotherapie mit der intensivierten Therapie 5-FU + Oxaliplatin bezüglich des zytogenetischen Schadens (MN/BNL und NPB/BNL) in Abhängigkeit von der Strahlendosis	47
Abbildung 15:	Zytogenetischer Schaden (MN/BNL und NPB/BNL) in Abhängigkeit von der PTV-Größe nach 50,4 Gy RCT.....	48
Abbildung 16:	Akuttoxizität der Haut	49
Abbildung 17:	Akuttoxizität der Blase	49
Abbildung 18:	Akuttoxizität des Dünndarms	50
Abbildung 19:	Akuttoxizität des Enddarms	51
Abbildung 20:	Akuttoxizität nach einzelnen Organsystemen	51

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	a) Übersicht der TNM-Klassifikation des Rektums	
	b) UICC-Klassifikation des Rektums.....	3
Tabelle 2:	Prospektive randomisierte Studien zur adjuvanten Therapie für RC.....	5
Tabelle 3:	Prospektive randomisierte Studien zur Gegenüberstellung von neoadjuvanter und adjuvanter Therapie für RC.....	5
Tabelle 4:	Übersicht des Patientenkollektivs	23
Tabelle 5:	Chemikalien und Lösungen.....	24
Tabelle 6:	Geräte	25
Tabelle 7:	Zubehör	26
Tabelle 8:	Software	27
Tabelle 9:	Ausgezählte Werte von Patient 147	36
Tabelle 10:	Vergleich des zytogenetischen Schadens (MN/BNL und NPB/BNL) in Abhängigkeit von der Strahlendosis bei Männern und Frauen.	43
Tabelle 11:	Messwerte der 5-FU-Konzentration im humanen Blut nach 50,4 Gy RCT.....	45
Tabelle 12:	Vergleich des zytogenetischen Schadens in Form von MN bzw. NPB pro binukleäre Zelle zwischen Arm A- und Arm B-Patienten bei 21,6 Gy und 50,4 Gy.....	47
Tabelle 13:	Übersicht der statistisch ausgewerteten Daten bezüglich eines Zusammenhangs von Akuttoxizität und zytogenetischem Schaden nach RCT.	52
Tabelle 14:	Zusammenfassung der PTV-Größe von allen Patienten	69
Tabelle 15:	Grad der Akuttoxizität aller Studienpatienten nach CTCAE-Kriterien.....	71

Verzeichnis der Abkürzungen

AF	azentrische Fragmente
AIO	Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie
ARO	Arbeitsgemeinschaft Radiologischer Onkologie
BNL	binukleäre Lymphozyten
CAO	Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Onkologie
CT	Chemotherapie
CTCAE	<i>common toxicity criteria for adverse events</i>
CTV	<i>clinical target volume</i> (klinisches Zielvolumen)
Cyt-B	Cytochalasin B
DACH	1,2Diaminocyclohexan
DC	dizentrische Chromosomen
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DFS	<i>disease free survival</i>
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EORTC	<i>European organisation for research and treatment of cancer</i>
FFCD	<i>Fédération Francophone de Cancérologie Digestive</i>
5-FU	Fluorouracil
GIT	Gastrointestinaltrakt
GRCSG	<i>German Rectal Cancer Study Group</i>
GTV	<i>gross tumour volume</i> (makroskopisches Tumolvolumen)
G1	Gap 1
G2	Gap 2
Gy	Gray
ICRU	<i>International commission on radiation units and measurement</i>
KFO	klinische Forschergruppe
KRK	kolorektales Karzinom
LENT	<i>late effects normal tissue</i>
MeV	Mega-Elektronenvolt
MN	Mikronukleus

MNT	Mikronukleustest
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NDI	<i>Nuclear Division Index</i>
NPB	Nukleoplasmabrücke(n)
OT	Objekträger
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBMC	periphere mononukleäre Zellen
PHA	Phytohämagglutinin
PME	partielle mesorektale Exzision
PTV	<i>planning target volume</i> (Planungszielvolumen)
RC	Rektumkarzinom
RCT	Radiochemotherapie
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Radiotherapie
RTOG	<i>Radiation Therapy Oncology Group</i>
SOMA	subjektiv, objektiv, Management, Analytik
S-Phase	Synthesephase
TME	totale mesorektale Exzision
TNM	Tumor-Nodus-Metastase
TP	Teilprojekt
UpM	Umdrehungen pro Minute
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
ZBT	Zytokinese-Block-Technik

1 Einleitung

1.1 Rektumkarzinom

Bei den kolorektalen Karzinomen (KRK) wird, abhängig von der Höhe der Lokalisation, zwischen Rektumkarzinom (RC) und Kolonkarzinomen unterschieden (Hahn et al. 2015). Entscheidend ist hierbei die mit dem Rektosigmoidoskop gemessene Entfernung des makroskopisch erkennbaren aboralen Tumorrandes von der Anokutanlinie (Junginger und Hermanek 2008). Das Rektum wird begrenzt durch den anorektalen und rektosigmoidalen Übergang und in drei Abschnitte unterteilt (Juninger und Hermanek 2008):

- oberes Rektumdrittel (12-16 cm)
- mittleres Rektumdrittel (6 bis < 12 cm)
- unteres Rektumdrittel (< 6 cm).

Diese Zuordnung ist von klinischer Relevanz, da sie Einfluss auf die Wahl der Therapie hat.

Für die Entstehung von RC sind sowohl exogene als auch endogene Risikofaktoren verantwortlich. Zu den exogenen Risikofaktoren werden bestimmte Ernährungs- und Lebensgewohnheiten gezählt. Sowohl der übermäßige Verzehr von tierischen Fetten in der Nahrung als auch die Menge verzehrten Fleisches steht in Korrelation mit dem Vorkommen von RC (Fuchs et al. 1999). Auch eine unzureichende Versorgung mit Vitaminen zählt zu den negativen Prädiktoren (Vohmann et al. 2011). Lebensgewohnheiten wie Alkoholkonsum, Zigarettenrauchen und Bewegungsmangel sind prädisponierend für das Auftreten eines RC (Midgley und Kerr 1999). Andere ernährungsbedingte Einflüsse wie ballaststoffreiche Lebensmittel senken signifikant das Risiko, an einem KRK zu erkranken (Ghadirian et al. 1997).

Als endogene Risikofaktoren sind das Vorkommen adenomatöser Polypen im Gastrointestinaltrakt sowie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn bekannt, die das Erkrankungsrisiko in geringem Umfang steigern (Graeven und Schmiegel 2004). Genetische Prädispositionen sind die familiäre adenomatöse Polyposis (KRK-Risiko bis 100%), das nicht-polypöse kolorektale Krebsyndrom (HNPCC) (KRK-Risiko 80-100%) sowie die Juvenile Polyposis coli (KRK-Risiko 20-60%) und das Peutz-Jeghers-Syndrom (KRK-Risiko 40%) (Graeven und Schmiegel 2004). Des Weiteren lässt sich ein erhöhtes Erkrankungsrisiko bei Patienten mit positiver KRK-Familienanamnese beobachten (Graeven und Schmiegel 2004). 90% aller KRK gehen aus Epitheldysplasien

hervor, die sich zu Adenokarzinomen transformieren. Bei 5-10% handelt es sich um muzinöse Adenokarzinome, bei 1% um Siegelringkarzinome (Graeven und Schmiegel 2004). So infiltrieren breitbasig aufsitzende, villöse Adenome die darunter gelegene Submukosa vergleichsweise schneller als gestielt wachsende Polypen der Dickdarmschleimhaut. Zur Reduzierung des malignen Entartungsrisikos werden Polypen der Dickdarmschleimhaut einer zeitnahen Polypektomie unterzogen. Ziel ist die frühestmögliche Identifikation und Entfernung auffälliger Polypen, um die Gefahr einer malignen Entartung zu senken (Schmiegel et al. 2010). Basierend auf der Erkenntnis, dass die morphologische Charakteristik der Adenome einen großen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat, wird eine regelmäßige Koloskopie im Rahmen einer Krebsfrüherkennung ab dem 55. Lebensjahr empfohlen (Newcomb 1992, Pox et al. 2012).

In Deutschland sterben rund 30.000 Menschen pro Jahr an den Folgen einer malignen Entartung des Dickdarms (Fuchs et al. 2011). Das KRK ist geschlechtsunabhängig die zweithäufigste Krebstodesursache in Deutschland. Heute werden, bei erheblich niedriger Sterblichkeitsrate, doppelt so viele KRK wie noch zu Beginn der 80er-Jahre diagnostiziert (Krebs in Deutschland 2012). Die Inzidenz der KRK variiert interkontinental. Die niedrigsten Raten findet man in Afrika und Südzentral-Asien, die höchsten Raten in Australien, Europa und Nordamerika (Jemal et al. 2011). Das RC ist, was die Allgemeinbevölkerung in den industrialisierten Ländern angeht, bei Nichtrauchern die häufigste, bei Rauchern die dritthäufigste Tumorerkrankung nach Lungen- und Brustkrebs (Parkin et al. 2005, Krebs in Deutschland 2006). Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen dem 60. und 75. Lebensjahr. Mit 75 Jahren erkranken Frauen im Mittel später als Männer, die durchschnittlich mit 69 Jahren betroffen sind (Krebs in Deutschland 2006). Nur 10% der Patienten erkranken vor dem 55. Lebensjahr. Selten tritt das KRK vor dem 40. Lebensjahr auf. Ab dem 80. Lebensjahr erkranken 470 von 100.000 Frauen, während bei Männern ab dem 85. Lebensjahr rund 50 von 100.000 betroffen sind (Krebs in Deutschland 2006).

1.1.1 Stadienadaptierte Behandlungsstrategien

Nach histopathologischer Sicherung lassen sich Rektumkarzinome anhand der TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer) einteilen. Die Erfassung des Tumor-Ausbreitungsgrades bezogen auf Primärtumorinfiltrationstiefe (T), Nodalstatus (N)

und Fernmetastasen (M) gilt dabei als prognoserelevant (Stocchi et al. 2001) und therapieplanweisend (Tabelle 1a und b).

Tabelle 1a: Übersicht der TNM-Klassifikationen des Rektums (Wittekind et al. 2013, S. 72)

TNM	Tumorausbreitung
Tis	Intraepithelial oder Invasion der Lamina propia
T1	Submukosa
T2	Muscularis propria
T3	Subserosa, nicht peritonealisiertes perikolisches /perirektales Gewebe
T4	viszerales Peritoneum bzw. andere Organe oder Strukturen
N1	1-3 regionäre LK bzw. Satellit(en) ohne regionäre LK-Metastasen
N2	≥ 7 regionäre LK
M1	(Mehr als) ein Organ oder Peritoneum

Tabelle 1b: UICC-Klassifikation (2010) des Rektums (Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014, S. 204)

UICC-Stadium	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1/T2	N0	M0
Stadium II	T3/T4	No	M0
Stadium III	Jedes T	N1/N2	M0
Stadium IV	Jedes T	N1/N2	M1

Im Falle einer frühzeitigen Diagnose (UICC-Stadium I/II) und Durchführung der geeigneten Therapie liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 85-90% (Schmiegel et al. 2010, Fuchs et al. 2011). Bleibt der Tumor jedoch bis zur Fernmetastasierung (Stadium IV) unentdeckt, sinkt die Heilungsrate nach 5 Jahren trotz Therapie auf weniger als 10% (Fuchs et al. 2011).

Trotz identischer Pathologie und Risikofaktoren von Rektum- und Kolonkarzinomen gibt es unterschiedliche Therapiekonzepte mit kurativem Ansatz.

Da sich diese Arbeit aber im Speziellen mit dem RC auseinandersetzt, wird im Folgenden nur auf die entsprechenden Therapien dieser Tumorentität eingegangen:

Die wichtigste Therapie des RC bei kurativem Ziel – stadienunabhängig - ist die chirurgische Tumoresektion. Der Operateur strebt dabei eine onkologische R0-Resektion des Primärtumors an, dessen Rand aus histopathologischer Sicht keine Tumorzellen aufweisen sollte (Klein et al. 2003). Onkologisch/chirurgische Grundsätze sind hierbei Radikalität nach proximal (vollständige Resektion des Lymphabflussgebietes entlang der Arteria mesenterica inferior), nach lateral (Resektion des Mesorektums, totale mesorektale Exzision, TME) und die *en bloc*-Tumorentfernung (Pinsk und Phang 2007). Die TME hat die chirurgische Behandlung des RC revolutioniert. Durch dieses Vorgehen konnte die Lokalrezidivrate der RC in den UICC-Stadien II und III auf 7,3% deutlich reduziert werden, was auch mit einer Verbesserung der Prognose einhergeht (Enker et al. 1995). Zudem konnte mit dieser schonenderen Operationstechnik eine deutliche Verbesserung der postoperativen Lebensqualität erzielt werden (Havenga et al. 1996). Trotz optimaler chirurgischer Therapie können bei Patienten mit RC des UICC-Stadiums II und III Lokalrezidive und Fernmetastasen im Verlauf auftreten (Schaefer et al. 2007). Auch wenn ein chirurgisches Vorgehen unabdingbar ist, so besteht Konsens darüber, dass die alleinige OP beim lokal fortgeschrittenen RC keine adäquate Therapie darstellt (Koukourakis 2012), weswegen ergänzend eine Radiochemotherapie (RCT) durchgeführt werden sollte (Hermann et al. 1999). Dadurch soll u.a. die Rate an Lokalrezidiven und Fernmetastasen deutlich verringert werden (GITSG 1985).

Die Therapie des RC erfolgt, den aktuellen Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft entsprechend, Stadien-adaptiert.

Da RC im UICC-Stadium I eine niedrige Lokalrezidiv- und Fernmetastasenrate haben, wird auf eine perioperative Therapie im Sinne einer (neo)adjuvanten R(C)T verzichtet, indem diese mit alleiniger radikaler Chirurgie behandelt werden. Studien belegen, dass eine Kurzzeit-Vorbestrahlung von 5x5 Gray (Gy) keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Lokalrezidivrate zwischen alleiniger OP und neoadjuvanter RT hat (Kapiteijn et al. 2001, Peeters et al. 2007).

Neben der Optimierung chirurgischer Maßnahmen wurden in den letzten Jahrzehnten auch verschiedene (neo)adjuvante Therapiekonzepte für lokal fortgeschrittene RC erprobt. In Hinblick auf die Rate an Lokalrezidiven erwies sich die adjuvante RCT als die überlegenere Therapiemodalität im Vergleich zur alleinigen adjuvanten RT bzw. CT (Krook et al. 1991, Wolmark et al. 2000). Außerdem übte die kombinierte adjuvante RCT im Vergleich einen positiven Einfluß auf das Gesamtüberleben aus (Rödel et al. 2004).

1990 wurde (Tabelle 2) von der „National Institutes of Health Consensus Conference“ und vier Jahre später im Konsensus der CAO (Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Onkologie), ARO (Arbeitsgemeinschaft Radiologischer Onkologie) und AIO (Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie) (Mitteilungen der Deutschen Krebsgesellschaft, 1994) die adjuvante RCT mit einer Bestrahlungsdosis zwischen 45 und 55 Gy und einer CT mit 5-Fluorouracil (5-FU) für die UICC-Stadien II und III als Standardtherapie festgelegt.

Tabelle 2: Prospektive randomisierte Studien zur kombinierten adjuvanten Therapie für RC
 Abkürzungen: NCCTG, North Central Cancer Treatment Group; NSABP, National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project

Studie	Jahr	N	Resultat
NCCTG (Krook et al. 1991)	1991	204	Adjuvante RCT im Vergleich zu alleiniger adjuvanter RT: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Senkung der Lokalrezidivrate ➤ Verbesserung des Gesamtüberlebens
NSABP (Wolmark et al. 2000)	2000	694	Adjuvante RCT im Vergleich zu alleiniger adjuvanter CT: <ul style="list-style-type: none"> ➤ senkt Lokalrezidivrate ➤ keine Verbesserung des Gesamtüberlebens ➤ Metastasierungsinzidenz unverändert

Bereits in den 70er Jahren setzte man sich mit einer RT vor der Operation auseinander (Higgins et al. 1975). Cedermark et al. beobachteten eine Reduzierung der Lokalrezidivrate verglichen mit der alleinigen chirurgischen Intervention (Cedermark et al. 1995, CCCG 2001). Wegen der positiven Ergebnisse präoperativer RT und postoperativer 5-FU-basierter CT im Rahmen multimodaler Therapiekonzepte beim RC entstand die Idee, neoadjuvante und adjuvante RCT-Konzepte miteinander zu vergleichen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Prospektive randomisierte Studien zur Gegenüberstellung von neoadjuvanter und adjuvanter Therapie für RC
 Abkürzungen: RCSG, Rectal Cancer Study Group; FFCD, Fédération Francophone de Cancérologie Digestive

Studie	Jahr	N	Resultat
RCSG (Sauer et al. 2004)	2004	823	Präoperative RCT im Vergleich zu postoperativer RCT:

			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Senkung der Lokalrezidivrate ➤ Reduktion von Nebenwirkungen ➤ kein Effekt des Gesamtüberlebens
FFCD 9203 (Gérard et al. 2006)	2006	733	Präoperative RCT im Vergleich zu präoperativer RT, adjuvanter CT: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Senkung der Lokalrezidivrate ➤ keine Verbesserung des Gesamtüberlebens ➤ Erhöhung von Nebenwirkungen

Sauer et al. veröffentlichten 2004 einen Vergleich zwischen präoperativer und postoperativer RCT bei lokal fortgeschrittenem RC. In dieser multizentrischen, randomisierten Phase-III-Studie zur adjuvanten und neoadjuvanten RCT (CAO/ARO/AIO-94-Studie) wurden im Zeitraum von 1994 bis 2002 zwei Therapiearme untersucht (Sauer et al. 2004). Patienten mit lokal fortgeschrittenem operablen RC (UICC-Stadium II/III) wurden dem Kontroll- oder Prüfarm zugeordnet. Im Prüfarm erhielten 421 Patienten eine neoadjuvante RCT bei einer Gesamtdosis von 50,4 Gy in Kombination mit 5-FU in der ersten und fünften Therapiewoche; im Kontrollarm erhielten 402 Patienten eine adjuvante RCT, ebenfalls bei einer Gesamtdosis von 50,4 Gy, und zusätzlich 5,4 Gy Tumorboost in Kombination mit 5-FU in der ersten und fünften Therapiewoche. Die Ergebnisse zeigten im präoperativen Arm eine signifikante Senkung der Lokalrezidivrate von 13% auf 6%. Gleichzeitig zeigte sich eine niedrigere akute (27% vs. 40%) sowie chronische (14% vs. 24%) Toxizität höheren Grades im präoperativen Prüfarm. Die Möglichkeit der sphinktererhaltenden Operationsverfahren steigerte sich von 19% auf 39%, verglichen mit der sofortigen Operation ohne Vorbehandlung. Ein Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben oder das Gesamtüberleben war nicht zu erkennen (Sauer et al. 2004). Insgesamt zeigte sich dennoch ein Vorteil des neoadjuvanten Therapiekonzeptes bei höherer lokaler Kontrolle und gleichzeitig geringerer Toxizität.

Die Erkenntnisse dieser deutschen Studie wurden zwei Jahre später durch die FFCD (Fédération Francophone de Cancérologie Digestive) 9203-Studie untermauert (Gérard et al. 2006). Seit der Konsensuskonferenz in Bochum 2004 ist nach der DKG (Deutschen Krebsgesellschaft) auf Basis dieser Studienergebnisse die neoadjuvante RCT (RT in Kombination mit 5-FU) die Standardtherapie lokal fortgeschrittener RC (UICC-Stadium II/III) (Bölke et al. 2005, Roh et al. 2009).

Ferner besteht heutzutage nach S3-Leitlinien starker Konsens über das multimodale Therapiekonzept mit kurativer Zielsetzung im unteren und mittleren Rektumdrittel. Der

neoadjuvanten RCT folgt die chirurgisch-onkologische Resektion des Primärtumors mit nachfolgender interindividueller adjuvanter CT.

1.1.2 Studien zur Optimierung der multimodalen Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms

Die ausgewerteten Langzeitdaten (Median 134 Monate) der CAO/ARO/AIO-94-Studie konnten ein Persistieren der besseren lokalen Kontrolle nach neoadjuvanter RCT bestätigen. Ein Effekt auf das Gesamtüberleben oder die Rate der Fernmetastasierung konnte jedoch weiterhin nicht nachgewiesen werden (Sauer et al. 2012). Mit dem Ziel der prognostisch relevanten RCT-induzierten Tumorregressionssteigerung initiierte die „German Rectal Cancer Study Group“ (GRCSG) die CAO/ARO/AIO-04 Studie „Prospektiv randomisierte, multizentrische Studie der Phase III: Präoperative Radio- /Chemotherapie und adjuvante Chemotherapie mit 5-Fluorouracil plus Oxaliplatin versus 5-Fluorouracil beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom im UICC-Stadium II und III“.

Die Studie schloss anfangs insgesamt 1265 Patienten ein. Die Ergebnisse waren von 1236 Patienten auswertbar. Die Patienten hatten ein histologisch gesichertes, fortgeschrittenes primäres RC bis 12 cm von der Anokutanlinie im Stadium II und III. 623 Patienten wurden dem Kontrollarm, 613 Patienten dem Prüfarm zugeteilt. Alle Patienten durchliefen eine neoadjuvante RCT sowie eine adjuvante CT. Während im Standardarm in der RCT und der postoperativen CT 5-FU verabreicht wurde, erhielten Patienten des Prüfarmes in der RCT und der postoperativen CT eine intensiviertere systemische Therapie mit 5-FU und zusätzlich Oxaliplatin. Patienten mit Karzinomen des oberen Rektumdrittels exkludierte die CAO/ARO/AIO-04-Studie. Ergebnisse aus früheren Studien bezweifelten die Wirksamkeit der neoadjuvanten RT bei RC des oberen Rektumdrittels (Kapiteijn et al. 2001). Intention dieser Studie war es, herauszufinden, ob eine intensiviertere RCT bzw. CT einen positiven Einfluss auf die Fernmetastasierungsrate, das Gesamtüberleben und das Tumorausprechen hat. Rödel et al. stellten fest, dass Oxaliplatin ohne Auftreten erhöhter Akuttoxizität in die multimodale Therapie integriert werden konnte und dass eine signifikant höhere Rate ($p < 0,05$) an pathologisch komplettem Tumorausprechen (17% vs. 13%) resultierte. Im Prüfarm zeigte sich zudem eine signifikante Verbesserung des 3-Jahres-DFS (krankheitsfreies Überleben) (Rödel et al. 2013). Eine weitere Publikation von Rödel et al. berichtet über die

endgültigen Ergebnisse der CAO/ARO/AIO-04-Studie bezogen auf die Auswirkungen des krankheitsfreien Überlebens. Der primäre Endpunkt, das krankheitsfreie Überleben, war auch nach einem medianen Follow Up von durchschnittlich 50 Monaten im Prüfarm (75,9%) signifikant besser als im Kontrollarm (71,2%) (Rödel et al. 2015).

Mit dem Ziel „Prüfung der KFO 179-1 (s. unten) Biomarker-Scores zur Prädiktion und Prognose fortgeschrittener, primär resektabler Rektumkarzinome der klinischen Tumorstadien UICC II-IV, die mit einer 5-FU basierten Standard-RCT gefolgt von einer TME behandelt werden“ wurden die Translationale Validierungsstudie - A und - B initiiert. Im Gegensatz zu weiter oben genannter Studie sind die beiden Validierungsstudien einarmig und nicht randomisiert. Die Translationale Validierungsstudie-A (TransValid-Studie A) beschäftigt sich seit 2011 mit Biomarker Scores zur Prädiktion und Prognose fortgeschrittener, primär resektabler RC der Tumorstadien UICC II-IV, die mit einer 5-FU-basierten Standard-RCT, gefolgt von einer TME und adjuvanter CT behandelt werden. Die Translationale Validierungsstudie-B (TransValid-Studie B) postuliert eine bessere lokoregionäre Ansprechrate und eine Verbesserung der Behandlungsverträglichkeit bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem RC. Dabei wird die Sequenz der einzelnen Therapiemodalitäten verändert. Der präoperativen RCT (5-FU und Oxaliplatin) mit anschließend verkürzter FOLFOX (5-FU, Oxaliplatin, Folinsäure) - CT (drei Zyklen) folgt eine TME. Durch das Vorziehen der eigentlich postoperativen CT soll das Auftreten von Therapieabbrüchen, z.B. aufgrund postoperativer Komplikationen, reduziert werden. Somit soll die Durchführung der kompletten Therapie wahrscheinlicher gemacht und eine mögliche Fernmetastasierung reduziert werden.

Die primären Endpunkte „Toxizität“ und „histopathologisch bestätigte Komplettremission“ der TransValid-Studie B werden explorativ mit den Ergebnissen der TransValid-Studie A verglichen werden.

1.1.3 Klinische Forschergruppe 179

Das Tumorgewebe reagiert individuell sehr unterschiedlich auf die neoadjuvante Behandlung bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem RC. Die Resultate reichen von komplett histopathologischen Remissionen bis hin zum Nichtansprechen auf die RCT (Ghadimi et al. 2005). Auch die Reaktionen des den Tumor umgebenden Normalgewebes auf die RCT sind unterschiedlich. Während einige Patienten bei der RCT unter starken Akutreaktionen leiden,

sind andere weniger intensiv betroffen (Wolff et al. 2010). Die interdisziplinäre Klinische Forschergruppe (KFO) 179 (Biological Basis of Individual Tumor Response in Patients with Rectal Cancer) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) an der Göttinger Universitätsmedizin widmet sich dem Studium der molekularbiologischen Hintergründe von Behandlungserfolgen und Therapie-assoziierten Nebenwirkungen eines jeden Individuums. Intention ist eine individuell angepasste Therapie für das RC zu entwickeln. Dabei sollten sowohl Art und Ausmaß an Nebenwirkungen als auch Behandlungserfolge in Abhängigkeit von dem Therapiekonzept vorhersehbar sein, um den Patienten den profitabelsten Therapieweg offerieren zu können. In Zukunft soll personalisierte Medizin, eine auf das Individuum speziell angepasste Therapie, mit der Einführung von Response- (Wirkung) und Toxizitäts-Scores (Nebenwirkungen), möglich sein. Mit Hilfe dieser Scores sollen Nebenwirkungen reduziert und Therapieerfolge optimiert werden bei möglichst hoher Lebensqualität des Individuums.

Die KFO 179 ist in neun eigenständige Teilprojekte (TP) unterschiedlicher Disziplinen aufgeteilt. Die Strahlentherapie (TP 6a) und die Klinische Pharmakologie (TP 6b) führen zusammen TP 6 („Biomarker für Toxizität und Ansprechen einer neoadjuvanten Radiochemotherapie bei Rektumkarzinom“) mit klinischen, pharmakogenetischen und funktionellen Analysen durch. Nach Erhebung und Dokumentation der Daten sollen diese, unter Berücksichtigung bereits bekannter molekularer Targets, als voraussagbare Faktoren dienen, um die Wirkungen der multimodalen RCT auf das Individuum zu eruieren. Helfen kann hierbei unter anderem auch der Mikronukleustest (MNT), der ggf. die individuelle Radiosensitivität eines jeden Patienten im Verlauf der Therapie auf zellulärer Ebene messbar machen kann.

1.2 Radio- und Chemotherapie

1.2.1 Auswirkungen der Radiotherapie auf zellulärer Ebene

Auftreffende ionisierende Strahlung beschädigt Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Sinne von Einzel- und Doppelstrangbrüchen, Basenschäden und abnormen Verbindungen von Molekülen (Herrmann und Baumann 1997). Aber auch indirekte Strahlenwirkung über den Umweg der Wasserradiolyse kann Molekülbindungen durch strahlenchemische Folgeprozesse verändern und somit DNA negativ beeinflussen. Auch in diesem Fall kann es zu

Basenschäden, Basenverlust, Zuckerschäden, Strangbrüchen und Vernetzungen kommen (Wannenmacher, Wenz und Debus, 2013). Die meisten dieser Schäden werden mittels enzymatischer DNA-Reparaturmechanismen schnell und effektiv beseitigt, so dass eine DNA-Integrität besteht. Den bedeutendsten Mechanismus der biologischen Wirkung einer Bestrahlung stellen nicht reparierte und fehlerkorrigierte DNA-Schäden dar.

Die Inzidenz von strahlenverursachten DNA-Schäden ist wesentlich größer als die der tatsächlich auftretenden Ereignisse wie Mutationen oder Untergang der Zellen. Jede bestrahlte Zelle verzeichnet etwa 4000 – 5000 DNA-Schäden pro Gy. Bei der Mehrzahl dieser Schäden handelt es sich um Basenschäden, Einzelstrangbrüche sowie ungefähr 40 Doppelstrangbrüche (Hennies 2010). Die Detektion der DNA-Schäden wird durch diverse Reparaturenzyme durchgeführt. Direkt während der Zellzyklus-Kontrolle werden die Destruktionen behoben (Murray und Hunt 1993, Natarajan und Palitti 2008). Die Unversehrtheit der DNA wird an den Gap1 (G1)- und Gap2 (G2)-Checkpoints während des Zellzyklus kontrolliert. Der Zellzyklus kann im Falle einer Schadensdetektion an dieser Stelle so lange arretieren, bis die Korrekturvorgänge abgeschlossen sind (G1- bzw. G2-Block). Die Zellen reagieren besonders während der prämitotischen Phase, der sogenannten G2-Phase, und der Mitose sehr empfindlich auf Strahlung, während der Synthesephase (S-Phase) hingegen zeigen sie die größte Strahlungsresistenz. Ist ein irreparabler Schaden vorhanden, so verfügt die Zelle über zwei Optionen. Zum einen kann sie den programmierten Zelltod, die Apoptose, durch den Tumorsuppressor p53 induzieren. Zum anderen kann sie den reproduktiven Zelltod einleiten, was einen Verlust der uneingeschränkten Teilungsfähigkeit bedeutet. An dieser Stelle verursachen Chromosomenschäden mit sofortiger oder verzögerter Wirkung eine Mitose-Unterbrechung und somit Hemmung der Tochterzellen. Von großer Bedeutung ist dieser Mitose-assoziierte Zelltod für die Antitumorwirkung einer RT und für das Auftreten von Schäden am Normalgewebe. Im Wesentlichen hängt das zelluläre Fortbestehen nach Bestrahlung von Faktoren wie der genetischen Disposition in Bezug auf (intrinsische) Strahlensensibilität, Zellzyklusphase, Fraktionierung der Strahlendosis und Anwesenheit von Sauerstoff ab (Tubiana 1990).

1.2.2 Radiotherapie-induzierte Nebenwirkungen

Bei einer Behandlung mit ionisierenden Strahlen zu therapeutischen Zwecken treten Nebenwirkungen am umliegenden Normalgewebe auf. Die RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) und EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) gruppieren Nebenwirkungen der Radiotherapie in Akuttoxizität und Spättoxizität ein (Cox et al. 1995). Akute (frühe) Nebenwirkungen treten per definitionem bis zum 90. Tag nach Ende der Strahlentherapie auf, chronische (späte) ab dem 91. Tag (Perez und Brady 1993 (a) und (b)). Letztere können auch noch nach Monaten bis Jahren in Erscheinung treten.

1.2.2.1 Akute Nebenwirkungen

Mit der Erweiterung der CTC (Common Toxicity Criteria) auf CTCAE (Common Toxicity Criteria for Adverse Events) in 2010 (National Cancer Institute 2010) wurden interdisziplinäre Definitionen der Akuttoxizität eingeführt, mit denen alle betroffenen Organsysteme unterschiedlichen Schweregraden zugeordnet wurden. Dies ermöglichte eine gezielte Erfassung von Quantität und Qualität aller akuten Nebenwirkungen bzw. unerwünschten Ereignisse.

Die Nebenwirkungen werden mittels CTCAE-Kriterien in sechs Schweregrade (Grad 0-5) eingeteilt. Während Grad 0 für das nicht Vorhandensein einer Toxizität steht, drückt Grad 5 den durch die Toxizität verursachten Tod des Patienten aus.

- Grad 0 – keine Toxizität
- Grad 1 – geringe Toxizität:
Beschwerden verschwinden spontan ohne therapeutische Maßnahmen; die onkologische Therapie kann ohne Unterbrechung weitergeführt werden.
- Grad 2 – moderate Toxizität:
Beschwerden meist ambulant durch Medikamentengabe therapierbar, so dass keine wesentliche Verzögerung der Gesamttherapie entsteht; Dosismodifikation (< 10%) oder Unterbrechung der onkologischen Therapie.
- Grad 3 – ausgeprägte Toxizität:
Beschwerden können oft nur durch intensiv medikamentöse und supportive Maßnahmen (wie z.B. Antibiotika i.v.) stationär therapiert werden, so dass es

zu einer Unterbrechung oder deutlichen Verzögerung (>7d) und/oder Dosismodifikation (>10%) der vorgesehenen onkologischen Therapie kommt.

➤ Grad 4 - lebensbedrohliche Toxizität:

Beschwerden, die zwingend und schnellst möglich therapiert werden müssen, da sie sonst binnen kürzester Zeit zum Patiententod führen können. Es bedarf sofortiger notfallmäßiger Hospitalisierung zur intensivmedizinischen Maßnahme oder chirurgischen Intervention. Daraus resultiert sofortiger definitiver oder temporärer Abbruch der geplanten onkologischen Therapie.

➤ Grad 5 – Tod des Patienten

Beschwerden, die zum Tod führen.

Nebenwirkungen wie Hautreaktionen, Diarrhöen, Übelkeit und Erbrechen sowie Leukopenien (Rödel et al. 1997) und der Urogenitaltrakt im Sinne von Dysurie, Pollakisurie und imperativer Harndrang treten als Akutreaktionen auf. Der Schweregrad der Akutreaktion kann die Behandlung erheblich beeinträchtigen (Rödel et al. 1997). Bei simultaner RCT von RC beeinflussen Faktoren wie Bestrahlungsvolumen, Geschlecht und Therapiesequenz das Ausmaß der Toxizität (Rödel et al. 1997). Die CAO/ARO/AIO 94-Studie dokumentierte insgesamt weniger als 15% akute schwerwiegende Nebenwirkungen (CTC^o>2). 12% der Patienten litten unter schwerwiegenden Diarrhöen. Hauterytheme, Übelkeit und Leukopenien wurden bei 3% der Patienten beobachtet (Sauer et al. 2003).

Dass einige Patienten aufgrund höhergradiger Toxizitäten nicht gemäß Studienprotokoll therapiert werden können, ist bekannt (Rödel et al. 1997). Höhergradige akute Organtoxizitäten müssen nicht immer das Therapieschema beeinflussen, sondern können sich auch als positiver Prädiktor für komplette histopathologische Regression darstellen. In unserer Abteilung konnten Wolff et al. zeigen, dass gerade Patienten mit höhergradigen Organtoxizitäten bessere Heilungschancen aufwiesen. Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen RC, die multimodal therapiert wurden, korrelierten signifikant höhergradige Akuttoxizität mit kompletter Tumorregression nach TME. Patienten, die unter Toxizitäten \geq Grad 2 gemäß CTC unter Enteritis, Proktitis und Zystitis litten, hatten eine dreimal häufigere Chance, eine histopathologische Komplettremission zu entwickeln als solche, die keine Toxizität aufwiesen (Wolff et al. 2010).

1.2.2.2 Chronische Nebenwirkungen

Der seit 1992 bestehende, von der EORTC und RTOG anerkannte LENT (Late Effects Normal Tissue)-SOMA (subjektiv, objektiv, Management, Analytik)-Score dient der systematischen Erfassung langfristiger Nebenwirkungen am Normalgewebe nach erfolgter Tumorbehandlung für RT, CT und RCT.

Das LENT/SOMA-Punktesystem verlangt Genauigkeit, simple Durchführung, weitgehende Anwendbarkeit, leicht verständlich und wiederholbar in der Umsetzung sowie eine Beschreibung des Schweregrades der Nebenwirkungen in aufsteigender Reihenfolge (Rubin et al. 1995). Bei jedem Organsystem berücksichtigt das Akronym „SOMA“, was auf deutsch für „subjektive, objektive, therapiebedingte Kriterien, Analyseverfahren zur Beschreibung von Nebenwirkungen“ steht, vier Kategorien.

Hierfür wird für jedes Organ zwischen vier Schweregraden (Grad 1-4) unterschieden. Die vier Schweregrade werden von Grad 0 und 5 ergänzt. Grad 0 beschreibt keine Spätfolgen, Grad 5 repräsentiert den Tod eines Patienten oder den Funktionsverlust eines Organs oder einer Struktur (Rubin et al. 1995).

1.2.3 Effekte der Chemotherapie auf zellulärer Ebene

Autonome Zellvermehrung und unkontrolliertes Wachstum zählen zu den typischen Charakteristika eines Tumors. Man unterscheidet gutartige von bösartigen Tumoren. Letztere charakterisieren sich durch invasives, destruierendes und rasches Wachstum sowie lymphogene oder hämatogene Metastasierung in den Organismus. Zur Bekämpfung von streuenden Tumoren und solchen, die die Organgrenzen bereits überschritten haben, finden bei einem multimodalen Therapiekonzept systemisch wirksame Arzneimittel Anwendung. Zusätzlich spielen beim RC 5-Fluorouracil (5-FU) und Oxaliplatin als „Radiosensitizer“, die den Tumor strahlenempfindlicher machen, eine Rolle. *In-vitro* und *in-vivo*-Studien haben den wirkungsverstärkenden Effekt von Oxaliplatin auf die Bestrahlung von Tumorgewebe geliefert (Hermann et al. 2008). Angriffspunkt der Zytostatika sind besonders schnell teilende Zellen, indem sie das Zellwachstum verhindern und ihre zytotoxische Wirkung entfalten. Abhängig vom Wirkmechanismus werden Chemotherapeutika in Alkylanzien, Antimetabolite, Mitosehemmstoffe und Topoisomerasehemmer gegliedert. Hierbei orientiert man sich am Prinzip der Polychemotherapie. Diverse Zytostatika greifen in unterschiedlichen

Phasen des Zellzyklus an, weshalb sie in Kombinationen verabreicht werden. Die Pharmaka wirken nicht nur auf die vom Tumor befallenen Zellen, sondern auch auf gesunde, schnell proliferierende Zellen des blutbildenden Organsystems, der Haut- und Hautanhangsgebilde, der Schleimhäute und Gonaden. Die verursachten DNA-Schäden können durch entsprechende zytogenetische Tests dokumentiert werden. Der in dieser Arbeit verwendete MNT erlaubt die Darstellung zytogenetischer Schäden in den Lymphozyten.

1.2.3.1 5-Fluorouracil

Das Zytostatikum 5-FU zählt zur Gruppe der Antimetabolite. Hierbei handelt es sich um einen Pyrimidinantagonisten (Abbildung 1), der bei Fehleinbau in die RNA/DNA an Stelle der Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin bzw. Uracil eine hemmende Wirkung auf die Zellteilung hat. Das Chemotherapeutikum 5-FU wird seit Mitte der 90er Jahre zur Behandlung des RC verwendet. 5-FU ist eine „Prodrug“, die selbst inaktiv ist und erst intrazellulär in ihre entsprechenden Nukleotide (FUTP, FdUMP und FdUTP) überführt und dann wirksam wird (Pizzorno et al. 1997). Diese Nukleotide sind funktionslose Antimetaboliten, die dann die DNA/RNA-Synthese stören. Der wichtigste Prozess scheint jedoch die Hemmung des zelleigenen Enzyms Thymidilatsynthetase durch FdUMP zu sein (Peters et al. 1987). Dieses Enzym ist essentiell für die DNA-Synthese und das Zellwachstum, da es durch Methylierung der Pyrimidinbasen die einzige intrazelluläre Quelle für die Thymin-de-novo-Synthese darstellt.

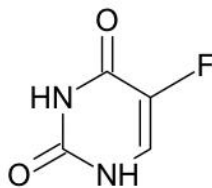


Abbildung 1: Chemische Struktur von 5-Fluorouracil (Longley et al. 2003)

Wird 5-FU in Fluorouridinmonophosphat (FUMP) transferiert, gibt es drei unterschiedliche Möglichkeiten der Bioaktivierung (Abbildung 2).

- 1) Mit Nukleotidkinasen wird Fluorouridinmonophosphat (FUMP) über Fluorouridindiphosphat (FUDD) zu Fluorouridintriphosphat (FUTP) metabolisiert. Kompetitive

Konkurrenz besteht zwischen den Substraten der RNA-Polymerase: Fluorouridintriphosphat (FUTP) und dem normalen Substrat Uridintriphosphat (UTP). Konzentrationsabhängig wird dann entweder FUTP oder UTP in die RNA eingebaut (Pizzorno et al. 1997). Als Folge der FUTP-Fehlintegration ist die RNA-Funktion beeinträchtigt bis hin zum Zelltod. Außerdem kommt es zu einer Hemmung der Reifung von ribosomaler RNA (rRNA) (Wilkinson et al. 1975).

- 2) Fluorouridinmonophosphat (FUMP) wird mittels Ribonukleotidreduktase zu Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) reduziert. Dieses konkurriert mit dem natürlich vorkommenden Substrat Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) und inhibiert die Thymidilatsynthetase (Abbildung 2). Die Thymidilatsynthetase ist ein Enzym, das für die Biosynthese von Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) benötigt wird. Die Anwesenheit von dTMP ist wichtig für DNA-Reparatur und Replikation. Ein ternärer Komplex, bestehend aus Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) und Methylentetrahydrofolat als Cofaktor, hemmt die Thymidilatsynthetase (Lipp 1999).
- 3) Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) wird zu Fluorodesoxyuridintriphosphat (FdUTP) transferiert, das in die DNA eingebaut wird und so die DNA-Stabilität beeinflusst (Abbildung 2). In Anbetracht der Tatsache, dass Fluorodesoxyuridintriphosphat (FdUTP) durch diverse enzymatische DNA-Reparaturmechanismen aus der DNA geschnitten werden kann, spielt dieser Effekt für die 5-FU-Wirkung eine zu vernachlässigende Rolle.

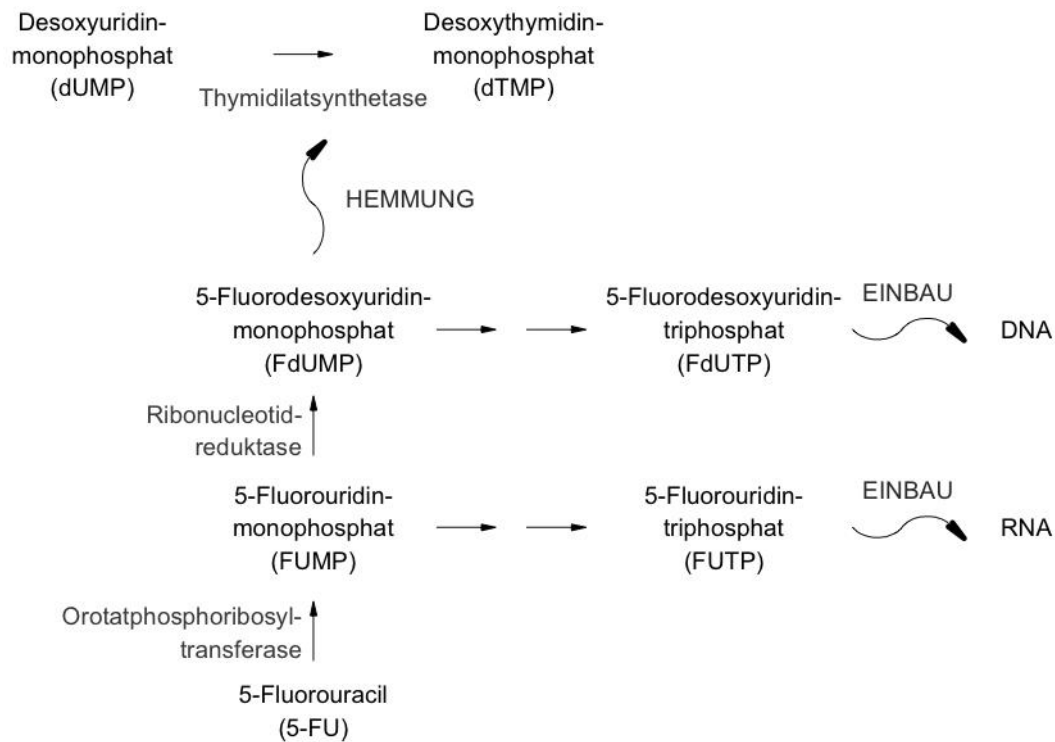


Abbildung 2: Metabolische Bioaktivierung und Wirkungsmechanismus von 5-FU (Kaiser 2003)

1.2.3.2 Oxaliplatin

Das Zytostatikum Oxaliplatin ist eine antineoplastische Substanz, die der Gruppe der Platin-Derivate zugeordnet wird. Das Platinatom bildet einen Komplex aus den beiden zweizähligen Liganden 1,2Diaminocyclohexan (DACH) und Oxalat (Abbildung 3).

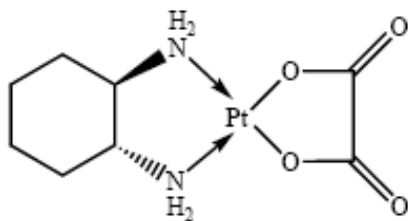


Abbildung 3: Chemische Struktur von Oxaliplatin (Aktories et al. 2005)

Aufgrund der Bildung von Platin-DNA-Addukten kann Oxaliplatin, wie für diverse Platinverbindungen üblich, seine Wirkung entfalten (Abbildung 4). Die Folgen sind ein Abbruch der DNA-Replikation und letztendlich der Zelltod. Aquakomplexe, die zu den Biotransformationsprodukten von Oxaliplatin zählen, bewirken durch DNA-Interaktionen diverse Intra- und Inter-Strang-Vernetzungen. Wahrscheinlich rufen die Platin-DNA-Addukte

innerhalb eines DNA-Stranges, deren Vernetzungen überwiegend zwischen zwei aneinander oder eng beieinander liegenden Guaninbasen oder einem benachbarten Guanin-Adenin-Basenpaar induziert sind, den eigentlichen zytotoxischen Schaden hervor. Die oben erwähnten Addukte treten häufig auf und sind auch in der Lage DNA-Replikation und Transkription zu hemmen (NGTATG 1992, Saris et al. 1996, Raymond et al. 1998).

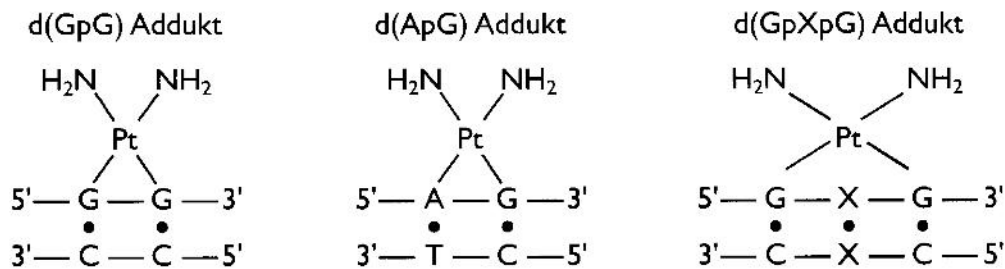


Abbildung 4: Die bedeutendsten Platin-DNA-Addukte binnen eines DNA-Stranges (Raymond et al. 2002)

1.3 Diagnostik zytogenetischer Schäden

1.3.1 Auswertung zytogenetischer Schäden peripherer Blutlymphozyten nach Strahlentherapie

Lymphozyten sind im Mittel etwa 8 µm große Zellen, die anteilig 30% der Leukozyten ausmachen. Sie unterscheiden sich in drei unterschiedlichen Populationen. Den größten Anteil bilden die T-Lymphozyten (ca. 75%), die zusammen mit den B-Lymphozyten (ca. 15% der zirkulierenden Lymphozyten) die adaptive Abwehr repräsentieren. Die kleinste Population bilden die natürlichen Killerzellen (ca. 10%). Nur ca. 2% der Lymphozyten befinden sich für kurze Zeit (ca. 1 h) im Blut. Der Großteil hält sich in den lymphatischen Organen, im Interstitium oder im Knochenmark auf. Hinsichtlich des Zellzyklus verbleiben die Lymphozyten meist in der G₀-Phase, der sogenannten proliferatorischen Ruhephase. *In-vivo* sind spezifische Antigene zur Stimulation der Zellteilung nötig. *In-vitro* finden bestimmte Mitogene wie Phytohämagglutinin (PHA), das die Lymphozyten stimuliert, Anwendung. PHA ist ein aus Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) isoliertes Glykoprotein, das zur Stimulation von T-Lymphozyten dient (Beninson et al. 1986). Einige Tage nach Aktivierung der T-

Lymphozyten werden die B-Lymphozyten stimuliert (Han und Dadey 1978). Deshalb werden hierbei hauptsächlich T-Lymphozyten, die 96 Stunden lang kultiviert wurden, ausgewertet.

Um den zytogenetischen Effekt nach Radiatio zu ermitteln, eignen sich die peripheren Blutlymphozyten (PBL) besonders gut, da sie

- zu den radiosensitivsten Zellen im menschlichen Blut zählen und sich im Blutbild ihre dosisabhängige Abnahme vergleichsweise gesteigert darstellt (Dutreix et al. 1987)
- überall im Körper im selben Verhältnis vorkommen und fortdauernd durchmischt werden
- als ruhende Zellen über die Fähigkeit zur Schadenskonservierung verfügen und diese nach PHA-Stimulation preisgeben
- bei niedriger *in-vitro*-Bestrahlung einen messbaren zytogenetischen Effekt bei zu vernachlässigbarer Apoptose aufweisen (Catena et al. 1996).

1.3.2 Mikronuklei und Mikronukleustest

Mikronuklei (MN) sind kleine, extranukleär vorkommende, eigenständige chromosomale Strukturen, die im Zytoplasma des Hauptkerns lokalisiert und von einer eigenen Plasmamembran umgeben sind. Sie haben keine Verbindung zum Hauptkern. Sie weisen meist eine ovale Form auf. Die Farbintensität entspricht der des Hauptkerns. Ihre Größe beträgt maximal 1/3, mindestens 1/16 des Hauptkerndurchmessers.

MN werden entweder aus Chromosomenfragmenten oder aus kompletten Chromosomen gebildet. Zur Entstehung von MN trägt der Verlust von Chromatin aus dem Hauptkern infolge einer Mutagenbelastung (Fenech 2000) oder einer Exposition mit ionisierender Strahlung bei. Sie können während der Mitose entstehen (Von der Hude et al. 2000), indem das Chromatinmaterial wegen fehlerhafter Zellteilung nicht in die beiden Tochterzellen integriert werden kann. Auch Zellen, die von Chromosomenaberrationen betroffen sind, durchlaufen die Anaphase der Mitose. Hierbei werden die Fragmente jedoch nicht gleichmäßig auf die beiden Tochterkerne verteilt, so dass MN entstehen. Nach Kondensation des extranukleär gelegenen Chromosomengefüges in der darauf folgenden Interphase, bilden sich ein oder mehrere MN. Mit DNA-Farbstoffen angefärbte MN lassen sich mit Hilfe eines Lichtmikroskopes nachweisen.

Schon in den 50er Jahren stellten Evans et al. nach radioaktiver Bestrahlung von Pflanzenzellen eine erhöhte Anzahl von MN fest. Ziel der Untersuchung war hierbei der Nachweis mutagener Wirkung (Evans et al. 1959). Zwanzig Jahre später, nach der Erkenntnis der Relation genotoxischen Potentials von Agenzien und dem Auftreten von MN, wurde der Mikronukleustest (MNT) beschrieben (Schmid 1975, Fritzenschaf et al. 1993). Heutzutage ist der MNT ein etablierter, zytogenetischer Test, der einfache und reproduzierbare Ergebnisse zum Nachweis von Chromosomenaberrationen liefert.

Die etablierte Auswertung der MN, von den Hämatologen auch als „Howell-Jolly Körperchen“ bezeichnet, stellte eine Option für die Dokumentation der Schäden an Chromosomen dar (Heddle 1973, Schmid 1975).

Beim MNT existieren mehrere geeignete Endpunkte. Auch variierten die Zellarten, so dass der MNT zum Beispiel mit Erythroblasten aus dem Knochenmark behandelter Nager ausgewertet wurde. Wegen der schnellen Kultivierbarkeit und hohen Empfindlichkeit werden zur Dokumentation von zytogenetischen Schäden nach RT Lymphozyten isoliert (Fenech und Morley 1985, Keulers et al. 1998, Venkatachalam et al. 1999, Tsai et al. 2001). Fenech und Morley wiesen bei humanen Lymphozyten nach, dass die Menge an MN mit dem Alter der Probanden und in späteren Studien mit der Dosis der Röntgenbestrahlung positiv korreliert (Fenech und Morley 1986). Fenech beobachtete die Entstehung der MN in Abhängigkeit von Blutplasmawerten - wie beispielsweise Vitamin B, C und E (Fenech und Rinaldi 1994, Fenech 1998) - und setzte den MNT ein, um Schäden an Chromosomen zu investigieren (Umegaki und Fenech 2000). Als wichtige demographische Variable im MNT gilt nicht nur zunehmendes Alter, sondern auch das Geschlecht. So weisen Frauen eine höhere MN-Rate auf als Männer (Fenech 1998).

Mit Einführung der Zytokinese-Block-Technik (ZBT) durch Fenech und Morley wurde der MNT weiterentwickelt (Fenech und Morley 1985, Fenech und Morley 1986). Nach nur einer Kernteilung bilden sich binukleäre Lymphozyten (BNL). Es werden nur die MN der BNL ausgewertet, so dass zuverlässige Vergleiche chromosomaler Schäden in Zellpopulationen in Bezug auf die Zellteilungskinetik ausgewertet werden können (Fenech 2000). Durch die Anwendung der ZBT wurde die Sensitivität des MNT erhöht.

Die ZBT basiert auf Modifikation der Mitose. Lymphozyten werden *in-vitro* oder *in-vivo* genotoxisch behandelt und anschließend mit PHA, das die Mitose induziert, stimuliert. 44 Stunden nach Lymphozytenkultivierung wird Cytochalasin-B (Cyt-B) in das Medium hinzugegeben (Fenech 1993). Bei Cyt-B handelt es sich um ein aus dem Pilz *Drechslera*

dermatioidea isoliertes Alkaloid, ein Mykotoxin, das durch Inhibition der Mikrofilamente die Zytokinese während der Mitose verhindert. Nach abgeschlossener Karyokinese kommt es zur Bildung von binukleären Zellen. Bei dieser Verfahrensweise können Zellen, die nach dieser Behandlung eine Mitose durchlaufen, mittels Lichtmikroskop untersucht werden, so dass die MN quantifizierbar sind. In die MNT-Auswertung werden nur zweikernige Zellen einbezogen.

Diese Methode ermöglicht nicht nur direkte, sondern auch verlässliche Vergleiche von Untersuchungen der Chromosomenaberrationen (Fenech 1993). Ende der 80er Jahre demonstrierten Littlefield und Ramalho, dass durch die ZBT zwischen 60% und 90% der azentrischen Fragmente (AF) erfasst werden (Ramalho et al. 1988, Littlefield et al. 1989). Dizentrische Chromosomen (DC) zeigen sich beim MNT in Form von Nukleoplasmabrücken (NPB). Wahrscheinlich entstehen NPB, wenn Zentromere von DC oder Chromatiden nach dem Zufallsprinzip in der Anaphase zu den gegenüberliegenden Zellpolen wandern (Umegaki und Fenech 2000, Crott et al. 2001). Jedoch ist der genaue Ursprung unklar (Fenech 2007). Es wurde bereits von einer engen Korrelation zwischen dizentrischen Chromosomen, Ringchromosomen und Nukleoplasmabrücken berichtet (Thomas et al. 2003).

Der MNT hat sich seit Ende der 60er Jahre als „Cytome“ - Test etabliert, der ein Urteil über Zellproliferation, Zelltod und chromosomale Veränderungen zulässt (Evans et al. 1959, Umegaki und Fenech 2000, Fenech 2007). Heutzutage zählt dieser in der Mutagenitätsforschung zu den routinemäßig eingesetzten Nachweismethoden und gilt als bedeutender Bestandteil der genetischen Toxikologie.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel des Teilprojektes 6 der Klinischen Forschergruppe 179 (1.1.3) ist die Ermittlung zuverlässiger Prädiktoren, mit denen die Sensibilität eines jeden Individuums auf Radiochemotherapie oder Radiotherapie vor Therapiebeginn bestimmt werden kann. Zudem soll ein Modell etabliert werden, das eine realistische Prognose intolerabler, klinischer Toxizitäten ermöglicht.

Die vorliegende Untersuchung verfolgt das Ziel, die Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten nach *in-vivo*-Bestrahlung beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom (UICC

II-IV) zu eruieren. Dabei sollen biologische und klinische Variablen ermittelt werden, die das Ausmaß an DNA-Schäden beeinflussen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Folgendes geprüft und diskutiert:

- Analyse der DNA-Schäden mit dem Mikronukleustest zum jeweiligen Zeitpunkt der Blutentnahmen vor, während und nach der Radiochemotherapie
- Untersuchung des Einflusses patienten- (Patientengeschlecht, -alter, Zeitpunkte während der Therapie) -und behandlungsbezogener Faktoren (Dosis und Art der Chemotherapie, Planungszielvolumen) auf die Ergebnisse des Mikronukleustests
- Prüfung einer Korrelation zwischen der im Patientenblut bestimmten 5-FU-Konzentration und dem Auftreten zytogenetischer Schäden
- Prüfung einer Korrelation zwischen der Planungszielvolumengröße und dem Auftreten zytogenetischer Schäden mit dem Mikronukleustest
- Prüfung einer Korrelation zwischen dem Auftreten von therapieassoziierten Nebenwirkungen und der Häufigkeit zytogenetischer Schäden während und nach neoadjuvanter Radiochemotherapie.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv und angewandte Therapie

Die vorliegende Untersuchung umfasst ein Patientenkollektiv von 133 Patienten. Diese sind an einem lokal fortgeschrittenen RC (UICC-Stadium II bis IV) erkrankt. Alle Patienten wurden im Zeitraum von November 2007 bis Juli 2012 in der Universitätsmedizin Göttingen, Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie (Leitung Univ.-Prof. Dr. Dr. C. F. Hess) behandelt. Die multimodale Therapie erfolgte im Rahmen der prospektiv randomisierten CAO/ARO/AIO-04-Studie (1.1.2) oder in einer der beiden einarmigen, nicht randomisierten TransValid-Studie A oder TransValid-Studie B (1.1.2).

Die UMG-Ethikkommission genehmigte das Forschungsvorhaben der CAO/ARO/AIO-04-Studie, der TransValid-Studie A/B, der KFO 179 (1.1.3) und des Teilprojektes 6 (TP6) (Aktenzeichen: 07_2006 (EC Erlangen); 15/7/11 (EC Göttingen); 23/10/11 (EC Göttingen)). Im TP 6 „Toxizität, Pharmakogenetik“ der KFO 179, an dem sowohl die Abteilung der Strahlentherapie als auch die der Pharmakologie beteiligt sind, erfolgte die Probengewinnung. Jeder Patient willigte schriftlich in die Teilnahme an einer der oben genannten Studien, den damit verbundenen Untersuchungen im Rahmen der KFO sowie den Begleituntersuchungen des TP 6 ein. Bei randomisierten Studien wurden die Probanden dem jeweiligen Therapiearm per Zufall zugeordnet. Personenbezogene Störgrößen wurden nun sowohl auf den Kontroll- als auch auf den Prüfarm verteilt, was die Bildung vergleichbarer Studiengruppen ermöglichte.

Bei allen Patienten wurde ein histologisch gesichertes, fortgeschrittenes primäres RC bis maximal 12 cm von der Anokutanlinie (mit einem starren Rektoskop gemessen) diagnostiziert. Mittels Endosono- oder Computertomographie (bzw. Magnetresonanztomographie) wurde ein Stadium T3-4 und/oder Lymphknotenbefall (N+) festgestellt. Synchroner Fernmetastasen wurden mittels standardisierter Verfahren wie Röntgen-Thorax und Abdomensonographie (alternativ Computertomographie Thorax-Abdomen) diagnostiziert.

Drogen-, Medikamenten- oder Alkoholabusus, Schwangerschaft sowie mögliche zytotoxische Ereignisse wie eine RT wurden vor Therapiebeginn ausgeschlossen.

Von 133 multimodal therapierten Patienten mit lokal fortgeschrittenem RC waren 52 weiblich und 81 männlich. Der Altersmedian betrug 66,7 Jahre, das Minimum lag bei 22 Jahren, das

Maximum bei 87 Jahren. Bei 23 Patienten lag ein UICC-Stadium II vor, bei 100 Patienten ein UICC-Stadium III und bei 10 Patienten ein UICC-Stadium IV.

Da die Patienten drei unterschiedlichen prospektiven Studien (CAO/ARO/AIO-04-Studie, TransValid-Studie A, TransValid-Studie B) entstammten, differierte sowohl das CT-Regime als auch die folgende Therapiesequenz (Tabelle 4).

*Tabelle 4: Übersicht des Patientenkollektivs.
Die insgesamt 133 Patienten verteilen sich auf drei Studien.*

	CAO/ARO/AIO-04-Studie		TransValid-Studie A	TransValid-Studie B
	Kontrollarm	Prüfarm		
Patientenanzahl (n=133)	63	47	15	8
Gesamtanzahl	110		15	8
Geschlecht				
weiblich	25	17	7	3
männlich	38	30	8	5
Alter bei Diagnose (in Jahren)				
Min.-Max.	47-87	46-85	45-86	22-72
Mittelwert	68,1	64,9	69,6	61,3
UICC-Stadium				
II	15	6	2	0
III	47	34	13	6
IV	1	7	0	2
Therapie-Sequenz	RCT - TME - CT			RCT - CT - TME
CT-Regime	5-FU-Mono	Folfox	5-FU-Mono	Folfox
RT	Gesamtdosis 50,4 Gy - 28 Fraktionen à 1,8 Gy (1x tägl., 5x wöchentl.)			

Patienten der CAO/ARO/AIO-04-Studie, die dem Standardarm zugeteilt wurden, erhielten in der ersten (d 1-5) und fünften (d 29-33) Woche der RCT 120 Stunden lang eine Dauerinfusion mit 5-FU. Die Patienten erhielten eine Dosis von 1000 mg/m²/d. Patienten des Prüfarmes erhielten ebenfalls 5-FU als Dauerinfusion (d 1-14 und 22-35) mit einer Dosierung von 250 mg/m². Zusätzlich wurde während der RCT (d 1, 8, 22, 29) über 2 Stunden eine Dauerinfusion mit Oxaliplatin (50 mg/m² in 500 ml 5%iger Glukose) appliziert.

Etwa sechs Wochen nach Beendigung der RCT erfolgte die Operation. Weitere 4-6 Wochen später wurde die adjuvante CT gestartet.

Patienten der TransValid-Studie A wurde eine systemische 5-FU-Monotherapie als Radiosensitizer appliziert. Sie erhielten in der ersten (d 1-5) und fünften (d 29-33) Woche der

präoperativen RCT 5-FU (1000 mg/m²; i.v.). Die Bestrahlungsschemata waren wie oben beschrieben. Es folgte ein 6-wöchiges behandlungsfreies Intervall bis zur TME.

Patienten, die der Transvalid-Studie B zugeteilt wurden, erhielten neben der RT ebenfalls 5-FU (250 mg/m²) als Dauerinfusion (d 1-14 und 22-35). Zusätzlich wurde an Tag 1, 8, 22, 35 über 2 Stunden eine Infusion mit Oxaliplatin (50 mg/m² in 500 ml 5% iger Glukose) verabreicht. Drei Wochen nach Abschluss der RCT erhielten die Patienten eine CT mit verkürztem FOLFOX-Schema (Folinsäure 400 mg/ m², als 2-h Infusion an d 1; Oxaliplatin 100 mg/m² i.v. als 2h-Infusion in 500 ml Glukose 5% an d 1; 5-FU 2400 mg/m² als 46-h Dauerinfusion, an d 1, 15 und 30). Nach 3-4 Wochen wurde die TME durchgeführt. Auf eine zusätzliche postoperative CT wurde konsekutiv verzichtet.

Jeder Patient erhielt eine Abschlussuntersuchung sowie eine jährliche Nachsorge im Zeitraum von fünf Jahren, den Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft für KRK entsprechend (Schmiegel et al. 2004). Im Rahmen der Nachsorge wurde weiteres Probenmaterial gewonnen, das in weiteren Arbeiten ausgewertet werden wird.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

Tabelle 5: Chemikalien und Lösungen

Biocoll Separating Solution, Katalog-Nr. 6115	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Cytochalasin B von <i>Drechslera dermatioidea</i> , Katalog-Nr. C6762	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Diff-Quik® Färbeset, Katalog-Nr. 130832	Siemens Dade Behring	Berlin, Deutschland
DMSO Lot.No. 66K2318	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Fetales Kälber Serum, Katalog-Nr. S0115	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Glucose, Katalog-Nr. G 7021	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

HEPES-Puffer: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure Katalog-Nr. H7523-250G	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Methanol, Katalog-Nr. 106009	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid, Katalog-Nr. 3570160	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat, Katalog-Nr. 106329	Merck	Darmstadt, Deutschland
Phytohämagglutinin L (PHA-L), Katalog-Nr. M5030	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Streptomycin/Penicillin, Katalog-Nr. A2213	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
RPMI 1640 Pulvermedium, Katalog-Nr. T121-05	Biochrom AG	Berlin, Deutschland

2.2.2 Geräte

Tabelle 6: Geräte

Brutschrank, (37°C, 5%CO ₂), CO ₂ -Inkubator Function Line BB16	Heraeus	Hanau, Deutschland
Cytospin® 4 Zentrifuge, Shandon Bestell-Nr. A78300002	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Inverses Phasenkontrastmikroskop „Telaval 31“	Zeiss	Göttingen, Deutschland
Lichtmikroskop Standard 18	Zeiss	Göttingen, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy plus	Integra Biosciences	Chur, Schweiz
Pipetten Eppendorf Research mit Spitzen	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Reinwassergerät, Arium 611 VF	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Sterilisator	Memmert	Schwalbach, Deutschland
Wasserbad	GFL	Burgwedel, Deutschland
Werkbank Lamin Air, steril	Heraeus	Hanau, Deutschland

Zentrifuge Megafuge 1.0R, Katalog-Nr. 75003060	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
---	-----------------------------	--------------

2.2.3 Zubehör

Tabelle 7: Zubehör

50-ml-Röhrchen, Artikel-Nr. 62.547.004	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser, Artikel-Nr. 3700000	LO-Laboroptik GmbH	Friedrichsdorf, Deutschland
Eppendorf-Cups	Eppendorf-Nether- Hinz GmbH	Hamburg, Deutschland
Gewebekulturflaschen, 75cm ² , 250ml, Katalog-Nr. 658170	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Gewebekulturflaschen, 25cm ² , 50ml, mit Filterkappen, Katalog-Nr. 690175	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Immersionsöl 518F, Bestell-Nr. 444963-0000-000	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Hautdesinfektionsmittel, Alkoholisches Hautantiseptikum Kodan® Tinktur forte farblos Artikel-Nr. 104005	Schülke & Mayr GmbH	Norderstedt, Deutschland
Leucosep™-Röhrchen, Artikel-Nr. 163290	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Li-Heparin-S-Monovette®, 7,5 ml zur Plasmagewinnung, Bestell-Nr. 011604001	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Objektträger 76x26 mm Artikel-Nr. VA11310004FKB	Waldemar Knittel GmbH	Braunschweig, Deutschland
Pipetten serologisch, steril, 10ml, Bestell-Nr. 86.1254.001	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipetten serologisch, steril, 25ml, Bestell-Nr. 86.1685.001	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Safety-Multifly®-Set mit Adapter, 21G,	Sarstedt	Nümbrecht,

Bestell-Nr. 85.1638.235		Deutschland
Shandon TPX Filterkarten, Produkt-Nr. 5991022	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
S-Monovette®-Kanüle	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Trichter Shandon EZ Cytofunnels®, Produkt-Nr. A78710003	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Zählkammer 0,0025mm ² (Neubauer improved)	LO-Laboroptik GmbH	Friedrichsdorf, Deutschland

2.2.4 Software

Tabelle 8: Software

Excel, Version 2010.Ink	Microsoft	Redmond, USA
Eclipse Systems, Version 8.9	Varian Medical Systems	Helsinki, Finnland
Free software R, Version 3.0.2	www.r-project.org	Vienna, Austria
KaleidaGraph, Version 4.1	Synergy Software	Reading, USA
Kendall Package, Version 2.2	Programmierer Prof. A. I. McLeod	Western Ontario, USA
Tests MS-DOS® Anwendung	Programmierer PD Dr. H. A. Wolff	Göttingen, Deutschland
Word, Version 2010.Ink	Microsoft	Redmond, USA

2.3 Methoden

2.3.1 Bestrahlungsplanung und Messung der PTV-Größe

Bei jeder Strahlentherapie müssen bestimmte Zielvolumina definiert bzw. eingeschlossen werden:

- GTV (Gross Tumor Volume)

Makroskopisches Tumolvolumen, das klinisch palpabel/(bild-)diagnostisch sichtbar ist.

➤ CTV (Clinical Target Volume)

Volumen, welches das GTV einschließt/subklinische, mikroskopische Tumoranteile beinhaltet.

➤ PTV (Planning Target Volume)

Rein geometrisches Konzept, das neben dem CTV einen Sicherheitsabstand enthält. Dieser berücksichtigt Lagerungs- und Positionierungsungenauigkeiten, räumliche Verlagerungen des CTV durch Respiration und Peristaltik sowie unterschiedliche Füllungszustände benachbarter oder tumortragender Organe.

Auf Basis des PTV erfolgt die Bestrahlungsplanung. Unter möglichst optimaler Protektion des umliegenden Gewebes erfolgte die RT gemäß Studienprotokoll der CAO/ARO/AIO-04-Studie, der TransValid-Studie A und der TransValid-Studie B mit konventioneller Fraktionierung. Bei einer Gesamtreferenzdosis von 50,4 Gy wurde in 28 Fraktionen über 5-6 Wochen 5 Tage pro Woche mit einer täglichen Einzeldosis à 1,8 Gy im Referenzpunkt nach ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurement) - Report 50 (1993, Richter und Flentje 1998) bestrahlt. Zur Radiatio der tief liegenden RC wurden hochenergetische Photonen mit einer Energie von 6 MeV eingesetzt.

Die wichtigsten Anforderungen an eine konsistente Bestrahlungsplanung sind in den ICRU Reports 50 und 62 festgelegt: Das Zielvolumen sollte von der 95%-Isodose umschlossen sein und die maximale Isodose von 107% der Referenzdosis nicht überschreiten. Maximale Dosisinhomogenität im CTV und konformale Bestrahlung bei maximaler Schonung des normalen Gewebes sind erstrebenswert.

Das gesamte Sakrum, die Sakralhöhle, die dorsalen Strukturen der Blase und der Prostata bzw. der Vagina wie auch die präsakralen und iliakal-kommunen Lymphknoten bis zum Promontorium werden vom Bestrahlungsvolumen (PTV) umfasst. Für die Bestrahlung wurde eine isozentrische Mehrfeldertechnik (3- oder 4-Felder), 3DCRT (dreidimensionale konformale Strahlentherapie), IMRT (intensitätsmodulierte Strahlentherapien, bei der nicht nur die Form des Bestrahlungsfeldes sondern auch die Strahlenintensität an die Tumorform angepasst wird) oder VMAT (volumenmodulierte Rotationsbestrahlung) mit individuell erstellten Absorbern angewandt.

Um den Dünndarm - und bei Männern zusätzlich den Hoden - optimal zu schonen, wurden die Patienten in Bauchlage auf ein Doppellochbrett als Lagerungshilfe positioniert. Geräte-

einstellungen, Hautmarkierungen und Positionierung der Patienten wurden mit Fotos dokumentiert.

Für die Feldgrenzen wurden folgende anatomische Strukturen vorgegeben:

- Die obere kraniale Feldgrenze entspricht der Unterkante von Lendenwirbelkörper 5
- Die kaudale Feldgrenze ist im Bereich der Sitzbeine bzw. bei tiefsitzenden Tumoren 3-5 cm kaudal des Tumorunterrandes (Tumorunterrand <2cm an Linea dentata: Einschluss des Analkanals)
- Die dorsale Feldgrenze schließt das Os sacrum ein
- Die ventrale Feldgrenze wird definiert im Bereich der dorsalen Blasenhälfte und Prostata bzw. Scheidenhinterwand (mindestens 2 cm ventral der vorderen Tumorgrenze)
- Die laterale Feldgrenze findet sich 1-2 cm lateral der Linea terminalis

Bei der computertomographisch gestützten dreidimensionalen Bestrahlungsplanung betrug die Schichtdicke maximal 0,5 cm.

Die Bestrahlungsplanung wurde gemäß den Studienprotokollen, computertomographisch gestützt unter Anwendung des Eclipse Systems (Version 8.9 Varian Medical Systems, Helsinki, Finnland), durchgeführt. Dieses Programm berechnet nach Definition des CTV auch automatisch das PTV in cm^3 , welches hier durch Addition eines 10 mm anisotropen Randes zum CTV definiert wurde. Alle Behandlungspläne wurden gemäß der Empfehlungen der ICRU (s.o.) verifiziert.

Zur Überprüfung des Bestrahlungsvolumens am Strahlentherapiegerät wurden Verifikationsaufnahmen sämtlicher Bestrahlungsfelder bzw. des Isozentrums zu Beginn jeder Bestrahlungsserie, mindestens einmal wöchentlich sowie bei Feldänderungen angefertigt.

2.3.2 Blutprobengewinnung

Zur Bestimmung des 5-FU-Blutplasmaspiegels sowie zur Herstellung von MN-Präparaten wurden den Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten Blutproben entnommen.

2.3.2.1 Probengewinnung für Mikronuklei

Die Blutprobengewinnung zur Herstellung der MN-Präparate wurde wie folgt durchgeführt: Die venöse Blutentnahme am Arm des Patienten wurde mittels Sarstedt-Monovetten[®]-Kanülen oder Multifly[®]-Set mit Adapter durchgeführt. Insgesamt dreimal - vor Bestrahlungsbeginn, nach der 12. Bestrahlungsfraction und nach der letzten Bestrahlung, der 28. Bestrahlungsfraction - wurde jedem Patienten Blut entnommen. Zum ersten Abnahmezeitpunkt wurden drei S-Monovetten[®] à 7,5 ml Blut, also 22,5 ml, zu den letzten beiden Zeitpunkten zwei S-Monovetten[®], also 15 ml Blut benötigt. Patienten, die sich in der fünfjährigen Nachsorgeuntersuchung befanden, wurde jährlich ebenfalls 15 ml Blut entnommen. Die unterschiedlichen zu entnehmenden Mengen an Blut begründen sich darin, dass vor Therapiebeginn zusätzlich eine *in-vitro*-Bestrahlung des Blutes stattfand, was aber nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war.

2.3.2.2 Probengewinnung für 5-FU-Blutplasmaspiegel

Der Nanopartikel-Agglutinations-Immunoassay, der der Bestimmung der 5-FU-Konzentration in humanem Blutplasma dient, wurde bei 58 Patienten während neoadjuvanter RCT durchgeführt. Die 5-FU-Bestimmungen wurden in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

Die Probengewinnung für die Auswertung der individuellen 5-FU-Plasmaspiegel erfolgte frühestens nach Erreichen der „Steady State“-Konzentration, so dass die erste venöse Blutentnahme des Zyklus zwei Stunden nach Beginn der 5-FU-Infusion stattfand.

Patienten des 5-FU-Monotherapie-Regimes erhielten in der ersten und fünften Therapiewoche jeweils über fünf Tage eine 5-FU-Infusion. Ausgewertet wurden die 5-FU-Spiegel jeweils am ersten und dritten Tag nach Infusionsbeginn in der jeweiligen CT-Woche, so dass sich zum einen die zu Beginn der Therapie und zum anderen die sich im Verlauf entwickelnden 5-FU-Spiegel bestimmen ließen.

Patienten des 5-FU+Oxaliplatin-Schemas wurde jeweils 3 Stunden und 24 Stunden nach Oxaliplatin-Gabe an den Tagen 8, 22 und einen Tag nach Beginn des zweiten Zyklus Blut entnommen.

Die Blutentnahme erfolgte durch eine Venenpunktion. Bei den Blutentnahmeröhrchen wurden EDTA-Monovetten bzw. Lithium-Heparin-Monovetten, die jeweils über eine maximale

Aufnahme von 8 ml Blut verfügen, verwendet. Unmittelbar nach Entnahme wurde die Blutprobe direkt auf Eis gekühlt.

2.3.3 Aufarbeitung der Blutproben für den Mikronukleustest

2.3.3.1 Lymphozyten-Separation

Nach Blutentnahme wurden jeweils 10 ml des heparinisierten Patientenblutes in ein 50-ml-Röhrchen gefüllt, mit 20 ml Natriumchlorid (Verhältnis Blut: NaCl = 1:2) verdünnt und anschließend mit einem Pipetboy durchmischt. Um ideale Bedingungen zu erfüllen, musste das zu verwendende NaCl eine Temperatur von 37° C haben.

Um eine effiziente Lymphozyten-Separation aus dem peripheren Blut zu erzielen, wurden transparente Einmal-Leucosep™-Zentrifugen-Röhrchen aus Polypropylen, die über eine integrierte Polyethylen - Trennscheibe verfügen, benutzt. Diese Röhrchen wurden zuvor mit einer 3-ml-Biocoll-Trennlösung befüllt. Damit sich das hinzugefügte Separationsmedium Biocoll unterhalb der porösen Barriere befand, mussten alle Leucosep™-Röhrchen nach Befüllen des Mediums und Verschließen des Schraubverschlusses 30 Sekunden bei 1000 x g (2400 UpM) und Raumtemperatur zentrifugiert werden.

Das Gemisch aus antikoaguliertem Blut und 0,9%iger physiologischer Kochsalzlösung (Verdünnung Blut: NaCl = 1:2) wurde jeweils in 5 Leucosep™-Röhrchen à 6 ml aufgeteilt indem es vorsichtig auf die Trennscheiben gegossen wurde. Die insgesamt 10 Leucosep™-Röhrchen wurden in die dafür vorgesehenen Zentrifugeneinsätze für 15-ml-Röhrchen positioniert und austariert. Nach 15 minütiger Dichtegradient-Zentrifugation mit 2300 UpM bei Raumtemperatur und deaktivierter Bremse wurden Lymphozyten und periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) von Erythrozyten und Granulozyten isoliert. Das Isolat wurde in einer Interphase zwischen der Plasmafraktion und dem Separationsmedium angereichert. Von oben nach unten ergab sich folgende Schichtung nach Zentrifugation:

1. Plasma
2. Angereicherte Interphase - bestehend aus Lymphozyten und peripheren mononukleären Zellen (PBMCs)
3. Biocoll-Separationsmedium
4. Trennscheibe

5. Biocoll-Separationsmedium
6. Pellet (bestehend aus Erythrozyten und Granulozyten)

2.3.3.2 Lymphozyten-Zellkulturen und Mitosestimulus

Um eine Kontamination der Lymphozyten/PBMCs mit Thrombozyten auszuschließen, wurde die Plasmafraktion der zehn Zentrifugenröhrchen bis auf eine Schichtdicke von 5 – 10 mm mit Hilfe einer Pipette abgenommen und verworfen. Die Interphase konnte gut - unter Schräghalten der einzelnen Röhrchen und ohne Kontakt zur Trennscheibe - abpipettiert und in zwei Zellkulturflaschen überführt werden. In der einen Gewebekulturflasche befand sich die Gesamtheit aller Interphasen aus dem *in-vitro* bestrahlten Blut – was für die vorliegende Arbeit jedoch nicht relevant ist - in der anderen die Gesamtheit aller Interphasen aus dem nicht bestrahlten Blut.

Die Interphasen in den Zellkulturflaschen wurden mit RPMI-Nährmedium auf 50 ml aufgefüllt.

Die Nährlösung wurde vor Gebrauch aus 52,15 g RPMI 1640 Trockenmedium, 7,13 g Natriumhydrogencarbonat, 11,92 g 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure, 12,5 g Glucose und 25 ml Penicillin/ Streptomycin hergestellt. Es wurde dann mit bidestilliertem Wasser auf 5 Liter verdünnt. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert und mit inaktiviertem fetalem bovinem Serum angereichert. 450 ml steril filtriertes RPMI und 50 ml fetales bovines Serum ergaben das Mischverhältnis des Nährmediums.

Zur Anregung der Lymphozytenteilung wurden als Mitogen 500 µl Phytohämagglutinin (PHA) hinzugegeben. Dadurch erhielt man hauptsächlich Lymphozyten. Granulozyten starben aufgrund des Milieus während der Lymphozytenkultivierung ab. 44 Stunden wurden die Zellen im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) kultiviert.

Für die Zytokineseinhibition wurden die Zellen nach Kultivierung mit einer Pipette resuspendiert und unter keimarmen Bedingungen in jeweils ein 50-ml-Zentrifugen-Röhrchen überführt. Zur Bestimmung der Teilchenzahl pro Volumeneinheit diente die Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden mit Hilfe einer Pipette wenige Mikroliter aus dem 50-ml-Röhrchen entnommen und eine Zählkammer damit befüllt, indem - nach Erzeugen eines kleinen Tropfens an der Pipettenspitze - dieser an die Stelle zwischen Deckglas und Zählkammer appliziert wurde, so dass sich der Spalt - zwischen Hämocytozometer-Deckglas

und Kammerboden - durch Kapillarkwirkung füllte. Da ein inverses Phasenkontrastmikroskop verwendet wurde, mussten die zu zählenden Zellen nicht angefärbt werden.

Der Inhalt der beiden 50 ml-Zentrifugen-Röhrchen wurde danach bei 1200 UpM und Raumtemperatur acht Minuten zentrifugiert, so dass ein Pellet am Boden der Röhrchen entstand. Das Nährmedium wurde bis auf 10 ml abpipettiert und verworfen. Der Rest der Lösung wurde zum wiederholten Male resuspendiert und nochmals in jeweils zwei Gewebekulturflaschen überführt. Um eine Inhibition der Zytokinese, die während der Telophase abläuft, zu erzielen, wurden 750 µl Cyt-B Mix I hinzugefügt. Diese Lösung wurde nochmals 28 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Der Stock des Cyt-B Mix I, bestehend aus 600 µg Cyt-B pro ml Dimethylsulfoxid (DMSO), lagerte bei 4°C (kristalline Form). Dieser wurde direkt vor der Anwendung bei Raumtemperatur verflüssigt.

2.3.3.3 Lymphozytenkonzentration

Ziel der Verdünnung war eine Lymphozytenkonzentration von 30 000 und 15 000 Zellen pro 100 µl. Es wurden 10 ml in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und diese dann acht Minuten lang bei 1200 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert. Ein Pellet entstand am Boden des Röhrchens. Abhängig von der ausgezählten Lymphozytenzahl musste das Nährmedium entweder verworfen, oder die Suspension musste bei einer zu hohen Zelldichte mit zusätzlichem Medium verdünnt werden. Nach Herstellung der erforderlichen Konzentration von 30 000 Zellen pro 100 µl wurde von dieser zusätzlich eine 1:1 Verdünnung mit frischem RPMI-Medium in einem 15-ml-Zentrifugenröhrchen angefertigt, so dass eine Konzentration von 15 000 Zellen pro 100 µl resultierte.

2.3.3.4 Mikronukleuspräparatherstellung mittels Cytospin

Die Zytozentrifuge ist ein Gerät, das verwendet wird, um Zellmonolayer auf einen Objektträger (OT) zu bringen und dabei gleichzeitig die Zellintegrität zu bewahren. Vorteil dieser Methode ist der bessere Zellerhalt und die gute Darstellung aller in homogenen Flüssigkeiten vorhandenen Zelltypen. Durch Zentrifugalkräfte werden die Zellen auf einem klar definierten Bereich des OT sedimentiert und gleichzeitig abgeflacht, was eine gute

Zellkerndarstellung ergibt. Nachdem alle zehn OT in der dafür vorgesehenen Halterung platziert sind, wird zur Absorption von Restflüssigkeit jeweils eine Filterkarte befestigt, auf die ein Trichter (Cytofunnel[®]) gesteckt wird. Dieser Trichter ermöglicht über einen Kanal während der fünf minütigen Zentrifugation bei 1500 UpM und Raumtemperatur eine Verbindung zwischen Zellen und OT, so dass ein Zellmonolayer entsteht.

Zehn Cytofunnel[®] wurden mit 100 µl der Zellsuspension befüllt. Jeweils fünf bei einer Zellanzahl von 30 000 und 15 000 pro 100 µl. Letztendlich erhielt man zehn OT. Auf diese wurde Patientenummer, Art der Blutprobe, Datum der Cytospin und die jeweilige Zellanzahl notiert.

2.3.3.5 Schnellfärbung der Lymphozytenpräparate

Nach dem Cytospin mussten die OT 10 Minuten trocknen. Zur Fixierung der Lymphozyten wurden die OT für 10 Minuten in einen mit Methanol befüllten Behälter getaucht.

Die fettfreien OT wurden jeweils 5 x 1 Sekunde in einen Färbetrog, der mit Diff-Quik I[®] versehen war, getränkt und abgetropft. Der zweite Färbetrog war mit Diff-Quik II[®] gefüllt. Die OT mussten auch in diesen 5 x 1 Sekunde getaucht werden und anschließend abtropfen. Um überschüssiges Lösungsmittel zu entfernen, wurde jeder OT einzeln in ein bidestilliertes Wasserbad eingetaucht und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.4 Aufarbeitung der Blutproben zur 5-FU-Plasmaspiegelbestimmung

Innerhalb von weniger als zehn Minuten wurden die auf Eis transportierten Blutproben in das Labor gebracht, wo die Blutproben binnen 24 Stunden aufbereitet wurden, um anschließend ausgewertet zu werden.

Mittels Zentrifugation (zehn Minuten, 2200 UpM) wurde das Blutplasma isoliert und dann bei -80°C gelagert. Nach Auftauen der 5-FU-Plasmaproben wurden diese mit dem Gerät „Roche COBAS INTEGRA[®] 800“ (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und dem darauf installierten Programm „My5-FU-Kalibrator“ (Saladax, Bethlehem, USA) analysiert.

Der quantitative Zielbereich für die 5-FU-Exposition basiert auf der Berechnung der Menge des gemessenen, applizierten 5-FU und der Infusionsdauer nach standardisierten Methoden.

Die Ergebnisse der 5-FU-Spiegelbestimmung wurden unserer Abteilung freundlicherweise von Dr. Lena-Christin Conradi und Henriette Quack aus der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt (Quack 2015).

2.3.5 Lichtmikroskopische Auswertung der Lymphozytenpräparate

Das Auszählen der mit einer dünnen Ölimmersionsschicht benetzten Lymphozytenpräparate wurde mit einem Lichtmikroskop in 1000-facher Vergrößerung durchgeführt. 1000 BNL pro Patient pro Dosis (zu Beginn der RCT, nach 21,6 Gy RCT und nach 50,4 Gy RCT) wurden gezählt. Um das Ausmaß der zytogenetischen Schäden zu ermitteln, wurden folgende Zellen ausgezählt:

1. Mononukleäre Lymphozyten:

- ohne MN

2. BNL:

- ohne MN oder NPB
- mit einem MN
- mit zwei MN
- mit drei MN
- mit vier MN
- mit einer NPB
- mit einer NPB und einem MN
- mit einer NPB und zwei MN
- mit einer NPB und drei MN

3. Trinukleäre Lymphozyten:

- ohne MN oder NPB
- ab einem MN und/oder einer NPB

4. Tetranukleäre Lymphozyten:

- ohne MN oder NPB

- ab einem MN und/oder NPB

5. Nekrosen

6. Apoptosen

7. Mitosen

Die lichtmikroskopisch ausgezählten Daten von 133 Patienten wurden tabellarisch erfasst. Unten aufgezeigte Tabelle 9 steht exemplarisch für alle ausgezählten Patientendaten.

Tabelle 9: Ausgezählte Werte von Patient 147

Abkürzungen: K: Kern(e), N: Nekrosen, A: Apoptosen, M: Mitosen, S: DNA-Schaden (MN oder NPB)

Strahlen- dosis	BN+ 1MN	BN+ 2MN	BN+ 3MN	BN+ 4MN	BN+ Brücken	1 K	2 K	3K	4K	N	A	M	3K+S	4K+S
0 Gy	32	7	1	0	15	1627	1000	15	27	20	16	46	3	12
21,6 Gy	80	17	3	0	47	1722	1000	7	18	46	53	22	4	6
50,4 Gy	193	57	15	3	157	2035	1000	17	30	23	9	6	11	17

Um eine einheitliche Betrachtung der Zytokinese-blockierten binukleären Zellen zu gewährleisten, mussten bestimmte Anforderungen (Abbildung 5) erfüllt sein (Fenech 2000):

- Die Zellen sollten aus zwei Kernen bestehen.
- Die Kernmembran der zwei Kerne einer BNL sollte unversehrt sein und sich innerhalb desselben Zytoplasmas befinden.
- Die zwei Kerne sollten annähernd über die gleiche Kerngröße, Chromatindichte und Farbintensität verfügen.
- Eine dünne NPB, die nicht größer als $\frac{1}{4}$ des Kerndurchmessers ist, kann die beiden Kerne miteinander verbinden.
- Die Kernmembranen einer BNL dürfen einander tangieren, aber nicht überlappen
- Die BNL umfasst eine deutlich sichtbare, intakte und von umliegenden Zellen abgesonderte Zellmembran.

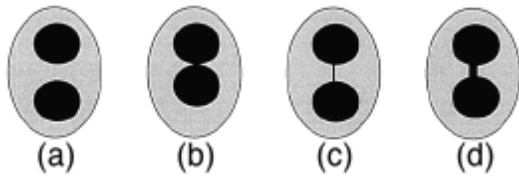


Abbildung 5: Skizze der an die Zytokinese-blockierten BNL gestellten Anforderungen (Fenech 2000, S. 85)

a) BNL mit zwei deutlich differenzierbaren Zellkernen; b) BNL mit sich berührenden Zellkernen; c) dünne NPB verbindet die beiden Zellkerne der BNL; d) NPB größeren Durchmessers zwischen den beiden Zellkernen der BNL

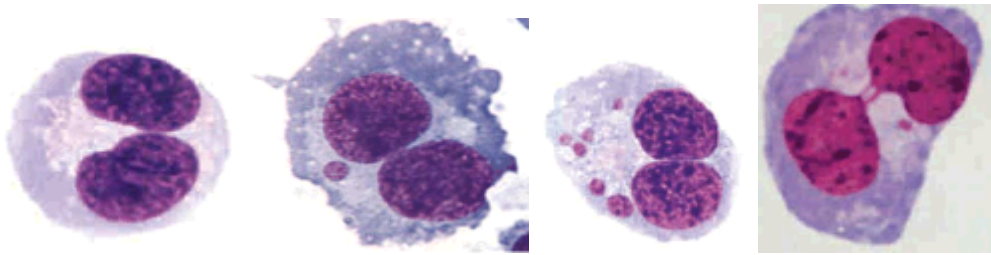


Abbildung 6: Beispiele für BNL (Fenech et al. 2003, S. 68)

Von links nach rechts: 1) Binukleärer Lymphozyt (BNL), 2) BNL zusammen mit einem MN, 3) BNL mit multiplen MN, 4) BNL mit MN und zwei NPB

Wichtige Charakteristika bei der Auswertung von MN (Abbildung 7):

- Der Durchmesser der MN darf nicht kleiner als $1/16$, aber nicht größer als $1/3$ des Zellkerns sein.
- MN weisen eine ovale Form - ohne Einziehung – auf, so dass Färbungsartefakte ausgeschlossen werden können.
- Es besteht keine Verbindung in Form einer NPB zwischen einem Zellkern und MN.
- MN und Zellkern können sich tangieren, sollten aber nicht übereinander liegen, so dass die Membranen voneinander abgrenzbar bleiben.
- Zellkern und MN besitzen die gleiche Chromatindichte.

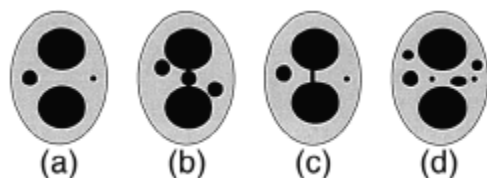


Abbildung 7: Skizze, die die geforderten Bedingungen der MN erfüllt (Fenech 2000, S. 86).

a) zwei MN mit einem Durchmesser von $1/3$ (links) und $1/9$ (rechts) des Kerndurchmessers; b) drei MN, die die BNL teilweise tangieren, aber nicht überschneiden; c) NPB verbindet BNL in Anwesenheit von zwei MN; d) BNL mit sechs MN unterschiedlicher Größe

Zelluläre Strukturen, die optisch MN ähneln, aber nicht in die Auswertung mit einbezogen werden sollten (Abbildung 8):

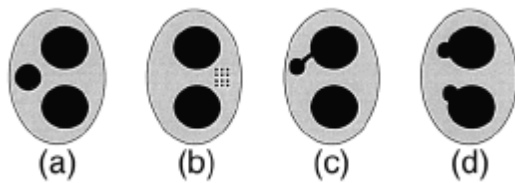


Abbildung 8: Zelluläre Gebilde, die MN ähnlich sehen, jedoch nicht exakt das Anforderungsprofil erfüllen (Fenech 2000, S. 86).

a) Trinukleäre Zelle (der Durchmesser des scheinbaren MN ist größer als $1/3$ des Durchmessers der anderen beiden Zellkerne); b) kompakte Tüpfelung im Zytoplasma; c) extrudiertes Kernmaterial, das wie ein MN mit einer verengten Verbindung zum Hauptkern erscheint; d) Blasen mit einer Verbindung zum Zellkern

Kriterien zur Auswahl von NPB:

- Eine NPB ist eine nicht unterbrochene nukleoplasmatische Verbindung zwischen zwei Kernen einer BNL.
- Die Breite der NPB kann deutlich variieren, sollte aber nicht größer als $1/4$ des Kerndurchmessers betragen.
- NPB sollten die gleiche Färbung wie die beiden Hauptkerne aufweisen.
- In seltenen Fällen werden mehr als nur eine NPB innerhalb einer BNL beobachtet.
- BNL mit NPB können mit oder ohne MN vorkommen.

2.4 Statistik

Der Wilcoxon-Test für gepaarte Daten (KaleidaGraph) wurde zur Prüfung eines statistischen Unterschiedes der Werte für MN und NPB bei den einzelnen Dosis-Leveln untereinander (vor RCT, nach 21,6 Gy und 50,4 Gy) angewandt. Es wurde die MN-Ausbeute vor RCT gegen die MN-Ausbeute nach 21,6 Gy RCT sowie die MN-Ausbeute nach 50,4 Gy RCT gegen die MN-Ausbeute nach 21,6 Gy RCT geprüft. Die NPB-Ausbeute vor RCT wurde gegen die NPB-Ausbeute nach 21,6 Gy RCT sowie die NPB-Ausbeute nach 50,4 Gy RCT gegen die NPB-Ausbeute nach 21,6 Gy RCT geprüft.

Im Anschluss wurde der zytogenetische Schaden (MN und NPB) von Männern und Frauen vor RCT sowie bei einer Dosis von 21,6 Gy und 50,4 Gy mit dem Rangsummentest nach

Wilcoxon verglichen. Kendall's Tau, der Rangkorrelationskoeffizient, wurde berechnet, um die erhobenen Daten der zytogenetischen Schäden mit den Werten der CT-Dosis sowohl mit den Werten der männlichen und weiblichen Probanden als auch mit den Werten der PTVs zu korrelieren. Diese Korrelationsanalyse diente der Überprüfung des statistischen Zusammenhangs zweier Merkmale.

Die nicht-parametrische Korrelationsanalyse nach Spearman (SPSS) wurde verwendet zur Prüfung einer Korrelation der Ausbeute zytogenetischer Schäden (MN und NPB) in Abhängigkeit von den drei definierten Zeitpunkten (vor RCT, nach 21,6 Gy RCT und nach 50,4 Gy RCT) und dem Faktor Patientenalter. So wurde auch der statistische Zusammenhang zwischen der Ausbeute zytogenetischer Schäden (MN) nach 50,4 Gy RCT und dem Faktor CT-Dosis geprüft.

Der zytogenetische Schaden (MN und NPB) von Patienten mit 5-FU-Monotherapie und Patienten mit FOLFOX-Schema wurde verglichen vor RCT sowie bei einer Dosis von 21,6 Gy und 50,4 Gy mit dem Rangsummentest nach Wilcoxon.

Eine Korrelation zwischen ermittelter Akuttoxizität nach CTCAE-Kriterien und MN-Ausbeuten wurde mittels Varianzanalyse geprüft. Die Analyse befasste sich mit der Organtoxizität der Haut, Blase, Dünndarm, Enddarm sowie der Gesamttoxizität.

Das Signifikanzniveau wurde als $\alpha = 5\%$ für alle statistischen Analysen bestimmt, die mit freundlicher Unterstützung von Dr. Stephan Lorenzen, Abteilung für Medizinische Statistik, Universitätsklinik Göttingen (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Tim Friede) durchgeführt wurden. Für alle statistischen Berechnungen wurde die freie Software „R“ (Version 3.0.2, www.r-project.org), die das „Kendall package“ (Version 2.2) beinhaltet, verwendet.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Blutproben von 133 Patienten (52 weiblich, 81 männlich) mit lokal fortgeschrittenem RC (UICC-Stadium II bis IV) zu je drei definierten Zeitpunkten – vor Therapiebeginn, nach 21,6 Gy RCT und nach 50,4 Gy RCT - aufbereitet und analysiert. Der individuelle 5-FU-Plasmaspiegel wurde von insgesamt 58 Patienten ausgewertet, die verteilt waren auf alle oben erwähnten Behandlungsgruppen.

3.1 Mikronukleustest im Verlauf der Radiochemotherapie

Insgesamt wurde eine große interindividuelle Streuung der ausgezählten MN und NPB festgestellt.

3.1.1 Mikronuklei

Die in der ZBT ausgezählten MN nahmen dosisabhängig im Verlauf der RCT signifikant zu ($p < 0,001$). Der Median und die Minimal- und Maximalwerte betragen 0,014 MN/BNL (0-0,057) vor RCT; 0,1255 MN/BNL (0,035-0,295) für 21,6 Gy und 0,227 MN/BNL (0,079-0,593) für 50,4 Gy (Abbildung 9).

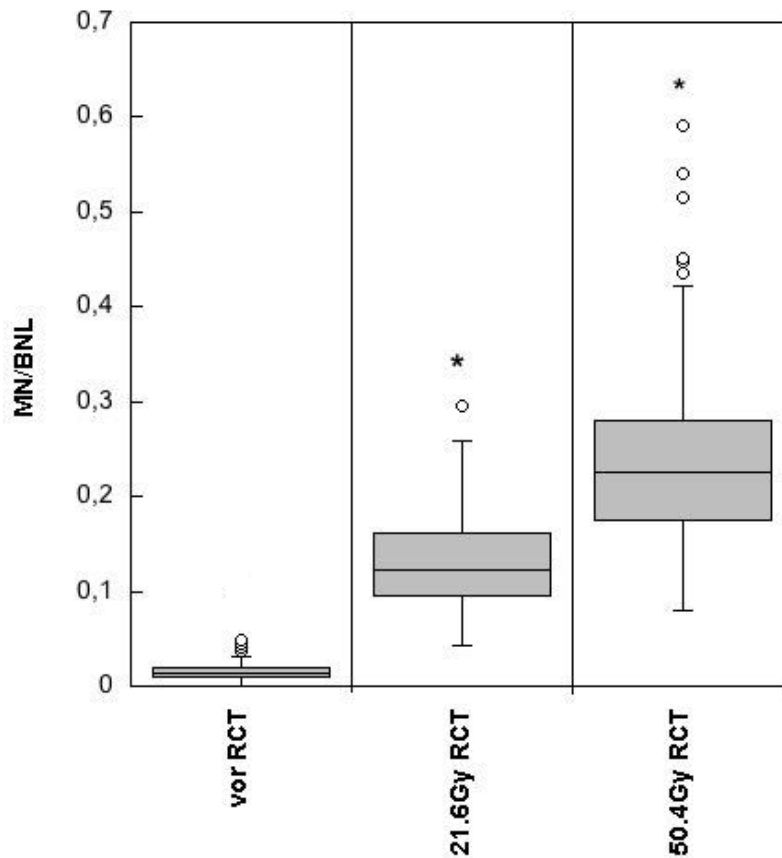


Abbildung 9: Zytogenetischer Schaden (MN/BNL) in Abhängigkeit von der Strahlendosis (Gy) – vor RCT, nach 21,6 Gy RCT und nach 50,4 Gy RCT. Die Ausbeuten an MN/BNL sind als Box Plots dargestellt.

(Kreise: Ausreißer; oberer Whisker: 95%-Quantile; unterer Whisker: 5%-Quantile; Box: oberes und unteres Quartil sowie Median, Stern: signifikanter Anstieg mit p -Wert $< 0,001$)

3.1.2 Nukleoplasmabrücken

Es zeigte sich eine signifikante Zunahme an NPB mit steigender Strahlendosis ($p < 0,001$). Der Median und die Minimal- und Maximalwerte betragen 0,002 NPB/BNL (0-0,027) vor RCT; 0,015 NPB/BNL (0,002-0,084) nach 21,6 Gy und 0,023 NPB/BNL (0-0,241) nach 50,4 Gy (Abbildung 10).

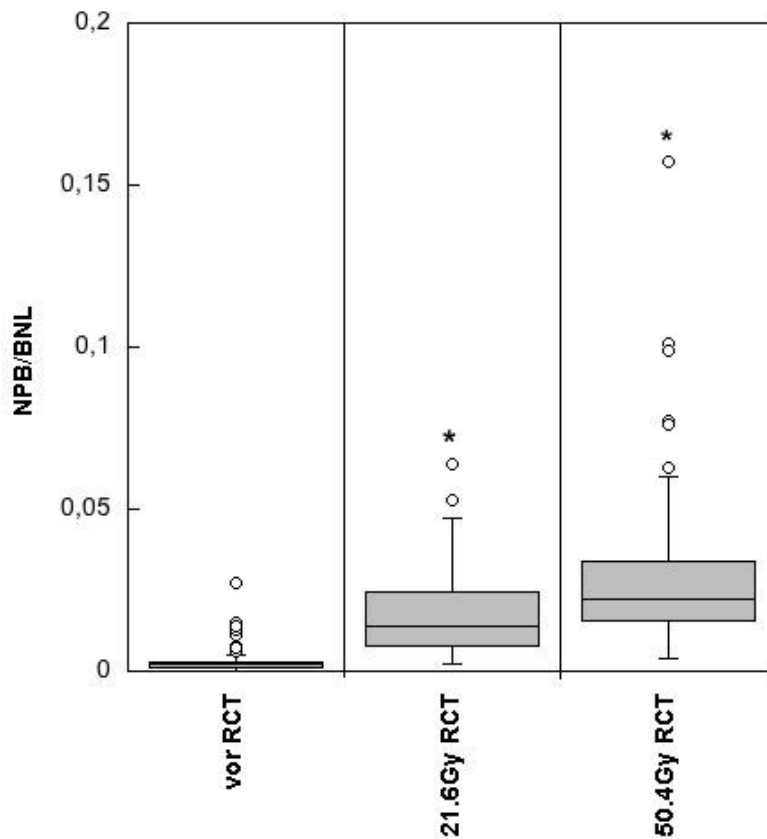


Abbildung 10: Zytogenetischer Schaden (NPB/BNL) in Abhängigkeit von der Strahlendosis (Gy) – vor RCT, nach 21,6 Gy RCT und nach 50,4 Gy RCT. Die Ausbeuten an NPB/BNL sind als Box Plots dargestellt.

(Kreise: Ausreißer; oberer Whisker: 95%-Quantile; unterer Whisker: 5%-Quantile; Box: oberes und unteres Quartil sowie Median, Stern: signifikanter Anstieg mit p -Wert < 0,001)

3.2 Einflussgrößen auf Variationen der Mikronukleustest-Ergebnisse

3.2.1 Geschlecht

Bezogen auf die zytogenetischen Schäden (MN und NPB) reagierten Frauen strahlenempfindlicher als Männer (Abbildung 11).

Unterschiede in der MN-Ausbeute waren signifikant höher vor RCT ($p < 0,01$) mit einem Median von 0,018 vs. 0,012 MN/BNL, nach 21,6 Gy ($p < 0,04$) mit einem Median von 0,140 vs. 0,119 MN/BNL und nach 50,4 Gy ($p < 0,02$) mit einem Median von 0,232 vs. 0,219 MN/BNL.

Eine signifikante Zunahme bezüglich der Unterschiede in der NPB-Ausbeute wurde nach 21,6 Gy ($p < 0,01$) gefunden. Vor RCT und nach 50,4 Gy wurden keine statistisch signifikanten

Unterschiede zwischen Frauen und Männern festgestellt. Der Median betrug sowohl bei Männern als auch bei Frauen 0,002 NPB/BNL anfangs, 0,018 vs. 0,013 NPB/BNL für 21,6 Gy, und 0,027 vs. 0,0215 NPB/BNL für 50,4 Gy (Tabelle 10).

Tabelle 10: Vergleich des zytogenetischen Schadens (MN/BNL und NPB/BNL) in Abhängigkeit von der Strahlendosis bei Männern und Frauen.

Strahlendosis (Gy)	Vergleichenes Geschlecht	MN			P	NPB			P
		Median	Min	Max		Median	Min	Max	
0	Mann	0,012	0	0,03	<0,01	0,002	0	0,027	>0,9
	Frau	0,018	0,005	0,057		0,002	0	0,018	
21,6	Mann	0,119	0,047	0,231	<0,04	0,013	0,003	0,084	<0,01
	Frau	0,140	0,035	0,295		0,018	0,002	0,064	
50,4	Mann	0,219	0,079	0,541	<0,02	0,0215	0,004	0,079	>0,07
	Frau	0,232	0,089	0,593		0,027	0,006	0,241	

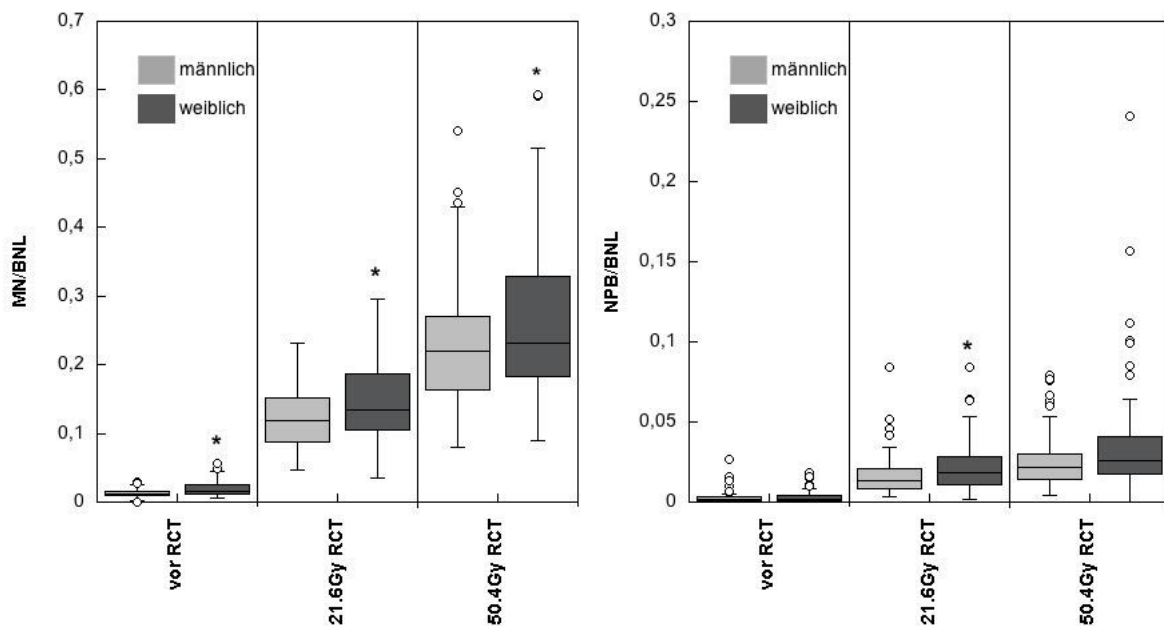


Abbildung 11: Gegenüberstellung des zytogenetischen Schadens (MN/BNL und NPB/BNL) von Männern und Frauen in Abhängigkeit von der Strahlendosis (Gy) – vor RCT, nach 21,6 Gy RCT und nach 50,4 Gy RCT. Die Ausbeuten an MN/BNL und NPB/BNL sind als Box Plots dargestellt. (Kreise: Ausreißer; oberer Whisker: 95%-Quantile; unterer Whisker: 5%-Quantile; Box: oberes und unteres Quartil sowie Median, Stern: signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern mit einem p-Wert < 0,04)

3.2.2 Lebensalter

Das mittlere Patientenalter betrug zu Therapiebeginn 66,72 Jahre (Minimum: 22 Jahre, Maximum: 87 Jahre). Für die Anzahl der MN bzw. NPB bezogen auf das Patientenalter zeigte die nichtparametrische Korrelationsanalyse zum Zeitpunkt des Therapiebeginns ($\tau=0,03$; $p=0,61$ bzw. $\tau=-0,083$; $p=0,15$), nach 21,6 Gy RCT ($\tau=0,012$; $p=0,85$ bzw. $\tau=-0,007$; $p=0,9$) und nach 50,4 Gy RCT ($\tau=-0,076$; $p=0,2$ bzw. $\tau=-0,06$; $p=0,32$) keine statistisch signifikante Abhängigkeit von der Anzahl der MN bzw. NPB vom Alter der Patienten (Abbildung 12).

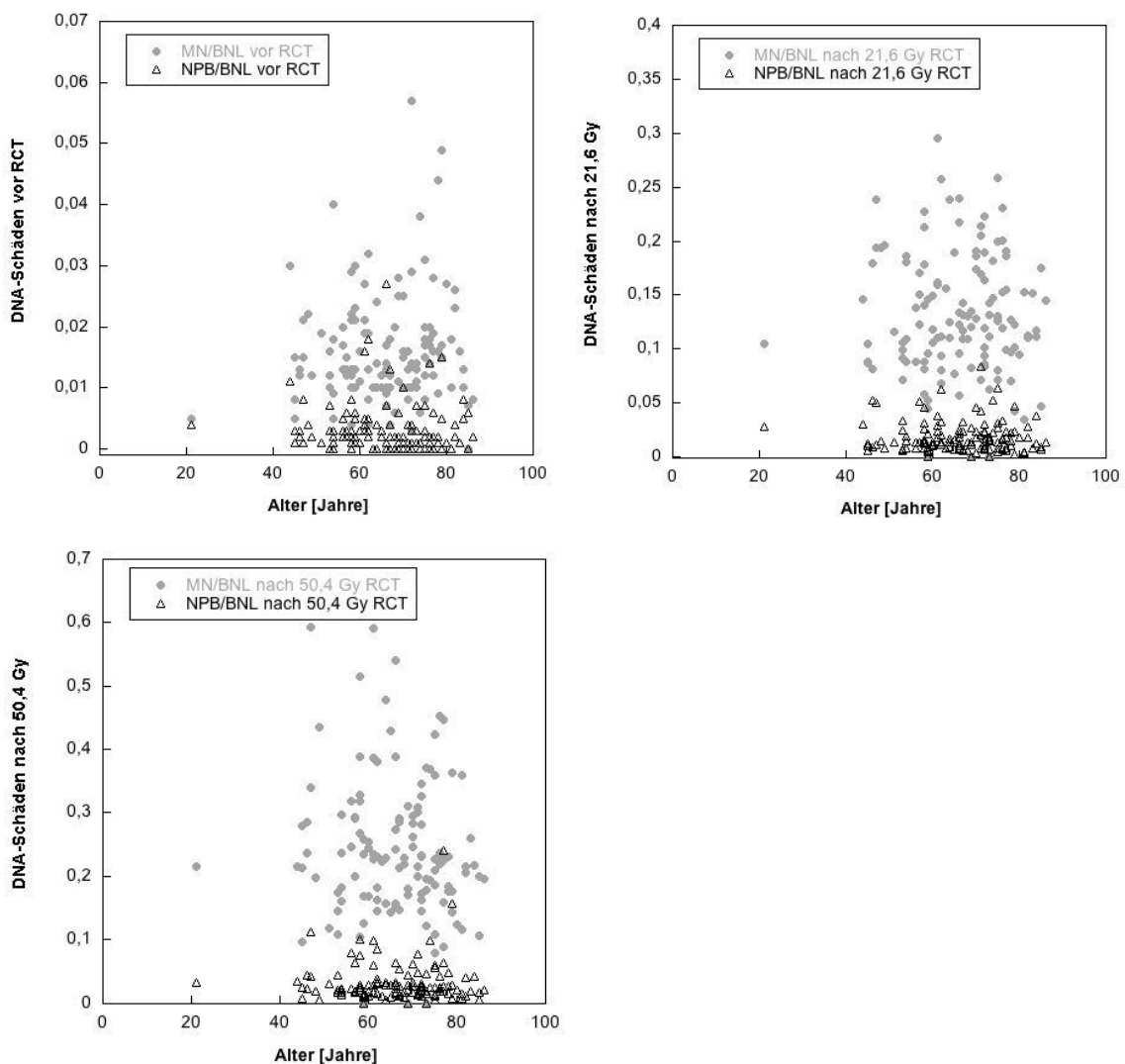


Abbildung 12: Zytogenetischer Schaden (MN/BNL und NPB/BNL) in Abhängigkeit vom Patientenalter - vor RCT, nach 21,6 Gy RCT und nach 50,4 Gy RCT. Die Ausbeuten an MN/BNL und NPB/BNL sind als Scatter Plots dargestellt.

3.2.3 Effekt der Chemotherapiedosis

Die Werte der bei 58 Patienten bestimmten 5-FU-Plasmaspiegel variierten interindividuell erheblich (Tabelle 11). Der Median betrug 20,37 mg·h/l (2,02 mg·h/l - 100 mg·h/l), der durchschnittliche 5-FU-Plasmaspiegel betrug 24,61 mg·h/l.

Tabelle 11: Messwerte der 5-FU-Konzentration [mg·h/l] im humanen Blut nach 50,4 Gy RCT, gemessen bei 58 Patienten

Patient	5FU-Plasmaspiegel [mg·h/l]
55	26,88
56	13,91
57	16,97
58	18,71
59	16,02
60	19,23
61	20,366
63	33,38
64	5,53
66	17,05
67	12,07
68	5,67
69	36,73
71	31,15
73	14,85
74	9,2
75	17
76	20,75
77	25,45
78	9,03
79	6,13
80	3,05
81	5,92
82	8,27
84	16,47
85	10,64
87	13,95
88	12,73
89	23,57

Patient	5FU-Plasmaspiegel [mg·h/l]
90	31,35
91	18,88
92	17,34
94	21,71
100	32,75
101	21,83
103	26,99
106	28,92
109	50,49
110	31,41
114	38,52
115	37,31
117	44,86
118	29,9
119	57,48
120	37,21
121	60,58
122	43,36
123	29,79
124	15,09
125	39,83
126	24,33
127	6,89
128	5,16
130	2,02
131	100
132	18,66
133	37,2
134	59,77

Es zeigte sich nach der neoadjuvanten RCT weder für die MN-Ausbeute ($\tau=-0,08$; $p=0,37$) noch für die NPB-Ausbeute ($\tau=0,05$; $p=0,58$) ein Zusammenhang mit dem gemessenen 5-FU-Spiegel. Die Ausbeute an MN bzw. NPB stieg nicht in Abhängigkeit von der 5-FU-Konzentration an (Abbildung 13).

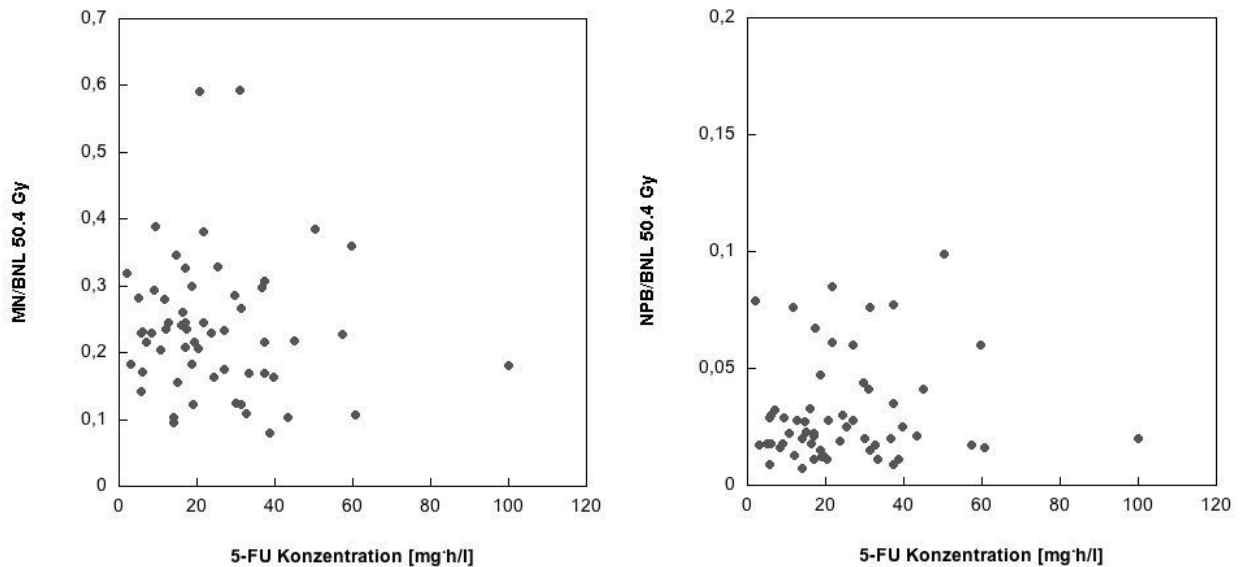


Abbildung 13: Zytogenetischer Schaden (MN/BNL und NPB/BNL) in Abhängigkeit von der 5-FU-Konzentration [mg·h/l] nach 50,4 Gy RCT. Die Ausbeuten an MN/BNL und NPB/BNL sind als Scatter Plots dargestellt.

3.2.4 Effekt in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Chemotherapien

Das Patientenkollektiv gliederte sich in zwei Behandlungsgruppen auf. In beiden Gruppen wurde eine neoadjuvante RCT durchgeführt, wobei die Art der CT nicht identisch war. Alle 133 Patienten absolvierten eine Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 50,4 Gy in 28 Einzelfraktionen à 1,8 Gy. Die eine Gruppe wurde mit einer 5-FU-Monotherapie begleitend zur neoadjuvanten RT behandelt. Die andere Gruppe erhielt als neoadjuvante Behandlung eine Kombination aus 5-FU und Oxaliplatin zur RT.

Der Vergleich der zytogenetischen Schäden (MN und NPB) von Patienten mit 5-FU-Monotherapie (Kontrollarm der CAO/ARO/AIO-04-Studie und TransValid-Studie A) und von Patienten mit dem FOLFOX-Schema (Prüfarm der CAO/ARO/AIO-04-Studie und TransValid-Studie B) wird in Tabelle 12 dargestellt. Es zeigte sich in Bezug auf MN und NPB für Patienten der 5-FU-Monotherapie jeweils eine minimal geringere Zunahme des

zytogenetischen Schadens im Median, die jedoch nicht statistisch signifikant war (Abbildung 14).

Tabelle 12: Vergleich des zytogenetischen Schadens in Form von MN bzw. NPB pro binukleäre Zelle zwischen Arm A- und Arm B-Patienten bei 21,6 Gy und 50,4 Gy. Die grau hinterlegten Werte vergleichen die Ausgangssituation der DNA-Schäden bei 0 Gy - vor RCT.

DNA-Schaden	Arm	0 Gy			21,6 Gy			50,4 Gy		
		Median	Min	Max	Median	Min	Max	Median	Min	Max
MN	A	0,0145	0	0,049	0,123	0,042	0,295	0,227	0,079	0,592
	B	0,013	0,005	0,057	0,126	0,035	0,257	0,229	0,089	0,593
NPB	A	0,002	0	0,027	0,014	0,002	0,064	0,022	0,004	0,157
	B	0,002	0	0,018	0,016	0,003	0,084	0,024	0	0,241

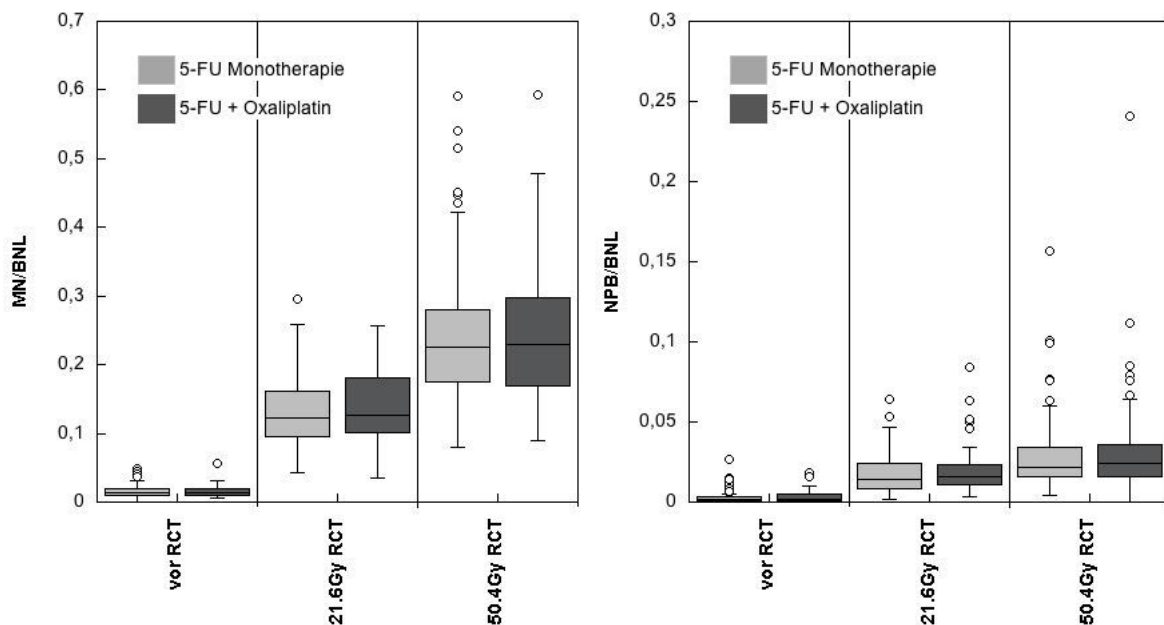


Abbildung 14: Gegenüberstellung der 5-FU-Monotherapie mit der intensivierten Therapie 5-FU + Oxaliplatin bezüglich des zytogenetischen Schadens (MN/BNL und NPB/BNL) in Abhängigkeit von der Strahlendosis (Gy) – vor RCT, nach 21,6 Gy RCT und nach 50,4 Gy RCT. Die Ausbeuten an MN/BNL und NPB/BNL sind als Box Plots dargestellt.

(Kreise: Ausreißer; oberer Whisker: 95%-Quantile; unterer Whisker: 5%-Quantile; Box: oberes und unteres Quartil sowie Median)

3.2.5 PTV

Das mediane PTV betrug 1414,7 cm³. Das größte erfasste PTV belief sich auf 2735,5 cm³, das kleinste auf 998,6 cm³ (siehe Anhang, Tabelle 14). Für die Anzahl der MN bzw. NPB in den

PBL bezogen auf die PTV-Größe zeigte die nichtparametrische Korrelationsanalyse zum Zeitpunkt des Therapieendes - nach 50,4 Gy RCT ($r=0,18$; $p=0,002$ bzw. $r=0,2$; $p=0,001$) - jeweils eine statistisch signifikante Abhängigkeit von der Anzahl der MN bzw. NPB von der PTV-Größe der Patienten (Abbildung 15).

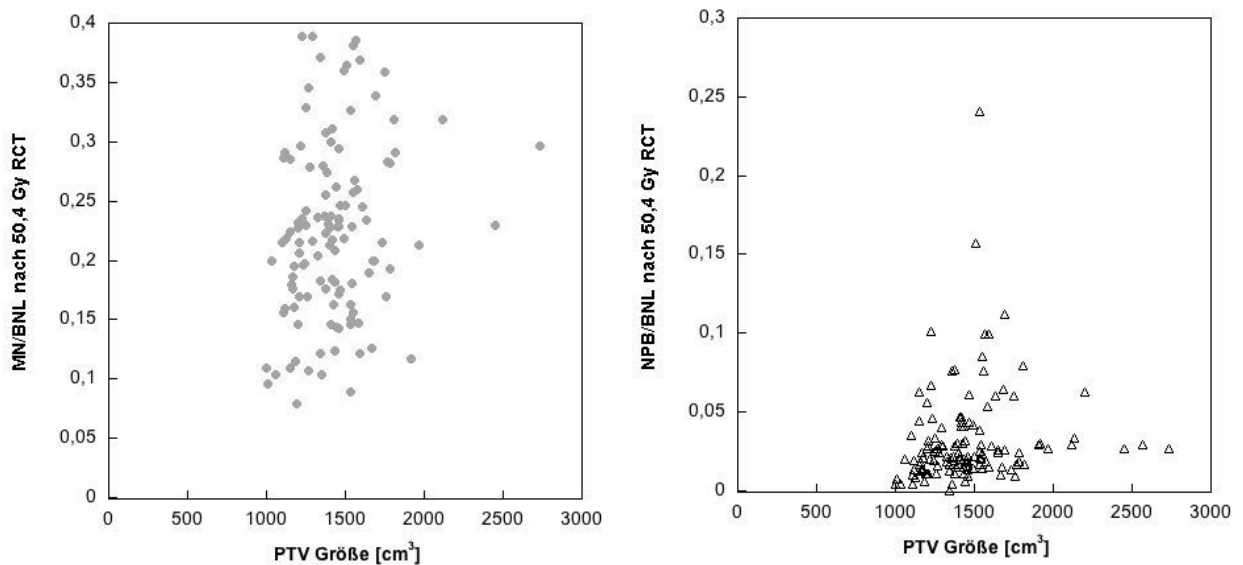


Abbildung 15: Zytogenetischer Schaden (MN/BNL und NPB/BNL) in Abhängigkeit von der PTV-Größe [cm^3] nach 50,4 Gy RCT. Die Ausbeuten an MN/BNL und NPB/BNL sind als Scatter Plots dargestellt.

3.3 Akute Organtoxizität

Die Akuttoxizitäten konnten bei allen 133 Patienten nach den CTCAE-Kriterien erfasst werden (siehe Anhang, Tabelle SEQ).

3.3.1 Haut

Bei 49 Patienten (16 weiblich, 33 männlich) wurde keine Akuttoxizität der Haut ermittelt (Grad 0). 52 Patienten (20 weiblich, 32 männlich) hatten eine Toxizität 1. Grades, 22 Patienten (11 weiblich, 11 männlich) eine Toxizität 2. Grades, 10 Patienten (5 weiblich, 5 männlich) eine Toxizität 3. Grades (Abbildung 16).

Zusammenfassend entwickelten 32 Patienten (16 weiblich, 16 männlich) eine höhergradige Toxizität CTCAE Grad ≥ 2 .

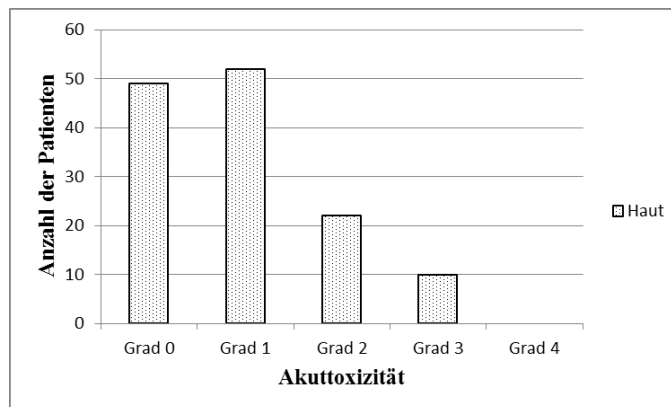


Abbildung 16: Akuttoxizität der Haut
(Grade nach CTCAE-Kriterien)

3.3.2 Blase

Für die Blase wurde bei 63 Patienten eine Toxizität Grad 0 (29 weiblich, 34 männlich) dokumentiert, Grad 1 bei 55 Patienten (18 weiblich, 37 männlich), Grad 2 bei 10 Patienten (3 weiblich, 7 männlich), Grad 3 bei 4 Patienten (2 weiblich, 2 männlich) und Grad 4 bei 1 Patienten (männlich) (Abbildung 17).

Insgesamt ließ sich bei 15 Patienten (5 weiblich, 10 männlich) eine höhergradige Toxizität der Blase ermitteln.

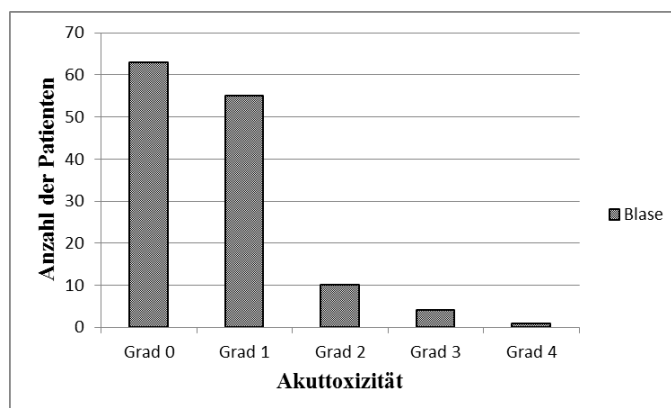


Abbildung 17: Akuttoxizität der Blase
(Grade nach CTCAE-Kriterien)

3.3.3 Dünndarm

50 Patienten (14 weiblich, 36 männlich) wiesen eine Toxizität Grad 0 auf, 56 Patienten (30 weiblich, 26 männlich) Grad 1, 19 Patienten (4 weiblich, 15 männlich) Grad 2, 5 Patienten (1 weiblich, 4 männlich) Grad 3 und 3 Patienten (3 weiblich) Grad 4 (Abbildung 18).

Eine höhergradige Toxizität des Dünndarms trat bei 27 Patienten (8 weiblich, 19 männlich) auf.

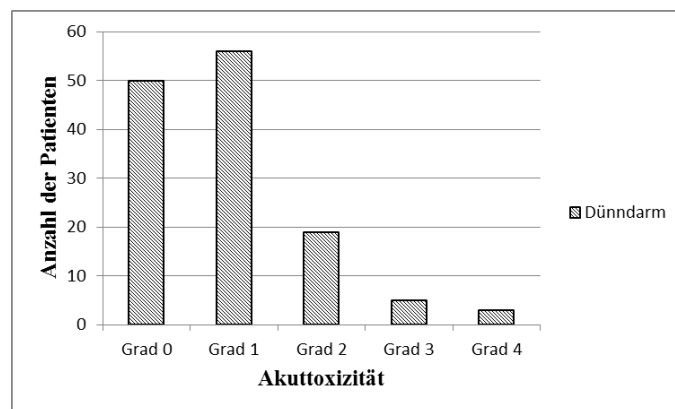


Abbildung 18: Akuttoxizität des Dünndarms
(Grade nach CTCAE-Kriterien)

3.3.4 Enddarm

Im Bereich des Enddarms wurde bei 19 Patienten (4 weiblich, 15 männlich) eine Toxizität Grad 0 erfasst, bei 65 Patienten (31 weiblich, 34 männlich) Grad 1, bei 30 Patienten (9 weiblich, 21 männlich) Grad 2, bei 17 Patienten (6 weiblich, 11 männlich) Grad 3 und bei 2 Patienten (2 weiblich) Grad 4 (Abbildung 19).

49 Patienten (17 weiblich, 32 männlich) zeigten eine höhergradige Toxizität des Enddarms.

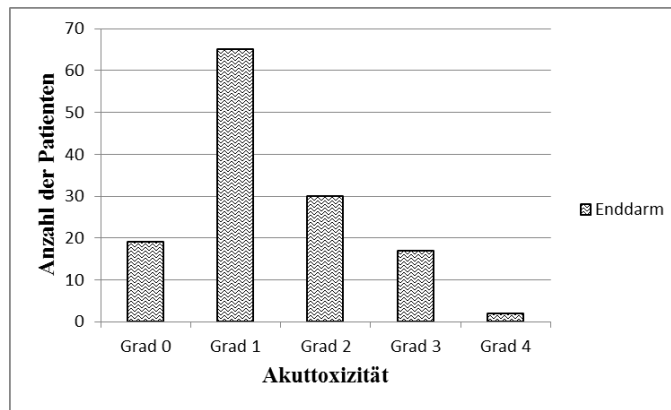


Abbildung 19: Akuttoxizität des Enddarms
(Grade nach CTCAE-Kriterien)

3.3.5 Gesamttoxizität im Überblick

Insgesamt trat bei 7 Patienten (7 männlich) keine Akuttoxizität auf, bei 54 Patienten (25 weiblich, 29 männlich) betrug die größte Toxizität Grad 1, bei 39 Patienten (15 weiblich, 24 männlich) Grad 2, bei 28 Patienten (20 weiblich, 8 männlich) Grad 3 und bei 5 Patienten (4 weiblich, 1 männlich) Grad 4 (Abbildung 20).

Aufgrund einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes musste 1 Patient stationär aufgenommen werden.

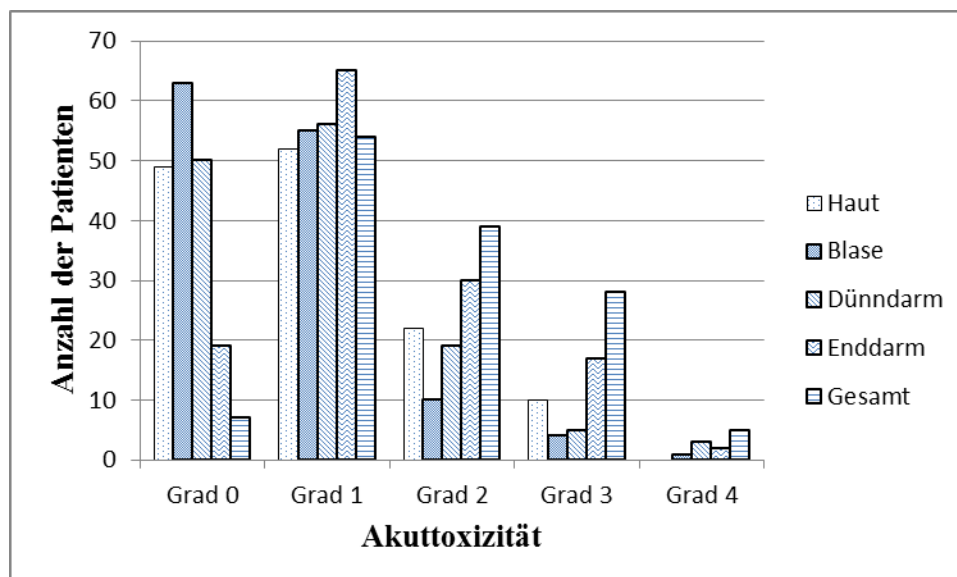


Abbildung 20: Akuttoxizität nach einzelnen Organsystemen
(Grade nach CTCAE-Kriterien).

3.3.6 Korrelation von Akuttoxizität und Ausbeute an Mikronuklei bzw. Nukleoplasmabrücken

Die Korrelationsanalyse zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang für das Auftreten von Akuttoxizitäten der einzelnen Organsysteme Haut, Blase, Dünndarm, Enddarm und der Ausbeuten an MN bzw. NPB zum Zeitpunkt nach 21,6 Gy RCT und 50,4 Gy RCT (Tabelle 13).

Tabelle 13: Übersicht der statistisch ausgewerteten Daten (τ und p) bezüglich eines Zusammenhangs von Akuttoxizität und zytogenetischem Schaden nach 21,6 Gy RCT und 50,4 Gy RCT. (τ = Kendall's Tau – Koeffizient)

Organ	Dosis (Gy)	MN		NPB	
		τ	P	τ	P
Haut	21,6	0,020	0,78	-0,109	0,12
	50,4	0,043	0,54	-0,103	0,14
Blase	21,6	0,068	0,34	0,115	0,11
	50,4	0,077	0,28	0,074	0,30
Dünndarm	21,6	0,089	0,2	0,083	0,24
	50,4	0,031	0,66	0,080	0,25
Enddarm	21,6	-0,046	0,51	-0,175	0,01
	50,4	-0,032	0,65	-0,128	0,07
Gesamt	21,6	0,045	0,51	-0,134	0,05
	50,4	0,089	0,19	-0,067	0,33

4 Diskussion

4.1 Lymphozytendetektion mittels Mikronukleustest

Gegenstand der vorliegenden experimentellen Untersuchung war die Detektion zytogenetischer Schäden wie Mikronuklei (MN) und Nukleoplasmabrücken (NPB) in peripheren Blutlymphozyten (PBL) unter Anwendung des Mikronukleustests (MNT). Dazu wurden binukleäre Lymphozyten (BNL) aus Blutproben der Patienten vor, während und am Ende der Radiochemotherapie (RCT) isoliert und unter dem Mikroskop ausgewertet. Als vorteilhaft gelten für den MNT die gute Durchführbarkeit, Auszählung großer Zellzahlen in einer für klinische Aussagen geeigneten Zeitperiode, Verlässlichkeit, Sensitivität und hohe statistische Aussagekraft (Wolff et al. 2011(b)). Insgesamt wurden Blutproben von 133 Patienten analysiert, die eine große interindividuelle Streuung aufwiesen. Faktoren, die im Zusammenhang mit dieser unterschiedlichen Sensitivität stehen könnten, werden anschließend diskutiert.

4.2 Einflussvariablen auf die Ergebnisse des Mikronukleustests

4.2.1 Geschlecht und Alter

Lebensgewohnheiten, Geschlecht und Alter sind Variablen, die Einfluss auf die zytogenetischen Schäden nehmen (Fenech und Bonassi 2011). Die Lebensgewohnheiten wurden in der vorliegenden Analyse nicht berücksichtigt, wohl aber das Geschlecht und das Alter der Patienten. Das Patientenkollektiv bestand aus 81 Männern und 52 Frauen. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung zeigten Frauen eine -im Vergleich zu Männern- höhere Ausbeute an zytogenetischen Schäden durch die Therapie. Die Variable Geschlecht wies zu allen analysierten Zeitpunkten einen signifikanten ($p < 0,01$ für 0 Gy, $p < 0,04$ für 21,6 Gy und $p < 0,02$ für 50,4 Gy RCT) Einfluss auf die Ausbeute an zytogenetischen Schäden in Form von MN auf. Ein statistisch signifikanter ($p < 0,01$) Unterschied zwischen beiden Geschlechtern bezüglich des zytogenetischen Schadens in Form von NPB stellte sich allerdings nur nach 21,6 Gy RCT heraus.

Die Variable Lebensalter übte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die MN bzw. die NPB-Ausbeute aus (siehe 3.2.2, Ergebnisse der nichtparametrischen Korrelationsanalyse).

Obwohl einige Studien belegen, dass mit zunehmendem Alter auch die Rate an zytogenetischen Schäden steigt (Coşkun et al. 2013, Nefic und Handzic 2013, Gentile et al. 2012, Fenech und Bonassi 2011), konnte dies in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Eine Ursache für dieses Ergebnis könnte sein, dass die meisten Studien alle Altersstufen vom Säugling bis zum Greis untersuchten. In dieser Arbeit waren nur 18% der Patienten unter 55 Jahren und nur ein Patient mit 22 Jahren jünger als 30 Jahre alt.

Die im Folgenden zitierten Arbeiten stimmen bezüglich des Einflusses des Geschlechts im Wesentlichen mit der vorliegenden Arbeit überein, bezüglich des Einflusses des Alters wurden aber unterschiedliche Ergebnisse gefunden.

Erste Arbeiten zum Einfluss des Alters und des Geschlechts auf die Ausbeuten im MNT wurden 1985 und 1986 von Fenech und Morley veröffentlicht. 1985 erhoben sie die MN-Ausbeuten in PBL von 103 gesunden Spendern zwischen 0 und 82 Jahren und stellten dabei eine annähernd 4-fache Erhöhung der MN-Ausbeute bei 80-Jährigen im Vergleich zu Neugeborenen fest (Fenech und Morley 1985 b). Ein Jahr später stellten Fenech und Morley an 42 Probanden fest, dass die Spontanrate an MN im MNT um 4,3% pro Jahr bei den 20-85-Jährigen zunahm (Fenech und Morley 1986).

1994 verglichen Fenech et al. die MN-Frequenz in zytokineblockierten PBL von 152 Frauen mit 113 Männern im Alter zwischen 20 und 89 Jahren. Sie teilten mindestens 15 Probanden pro Geschlecht einer Dekade zu. In allen Altersgruppen über 40 Jahren wiesen Frauen eine größere Streuung an MN auf als Männer. Sie beschrieben eine statistisch signifikante positive Korrelation ($p < 0,0001$) zwischen MN und Alter, beide Geschlechter betreffend. Alle analysierten Dekaden betreffend, zeigte sich bei Frauen eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Frequenz an MN als bei Männern (Fenech et al. 1994).

Barale et al. rekrutierten 1650 gesunde Italiener, um einflussnehmende Faktoren auf Schwesterchromatidaustausch und MN-Frequenz in PBL zu erforschen. Geschlecht und Alter schienen dabei die wichtigsten Variablen zu sein. Sie beschrieben einen Anstieg der MN-Frequenz bei Männern um 0,04/1000 MN und bei Frauen um 0,02/1000 MN pro Jahr. Ungeachtet des Geschlechtes hatten Probanden ≤ 40 Jahre niedrigere MN-Frequenzen, während Frauen > 40 Jahre signifikant höhere MN-Raten aufwiesen. Die MN-Rate der Männer tendierte zwischen dem 30.-50. Lebensjahr dazu, gleich zu bleiben (Barale et al. 1998). Ishikawa et al. untersuchten in einer japanischen Studie 71 gesunde Spender, von denen 38 männlich und 33 weiblich waren. Männer wiederum wiesen hier eine größere Frequenz an MN auf als Frauen. Der Unterschied der MN-Ausbeute erwies sich als statistisch

signifikant. Das mittlere Alter der männlichen Probanden lag bei 38,3 Jahren, bei den Frauen bei 33,2 Jahren (Ishikawa et al. 2003).

Eine Metaanalyse mit weltweiten Daten (fast 7000 Probanden aus 16 Ländern), die vom HUMN (HUMAN MicroNucleus) Projekt gesammelt wurden, bestätigte eine statistische Signifikanz für die ansteigende MN-Frequenz bei Frauen im Vergleich zu Männern (Bonassi et al. 2001).

In einem Review nahmen Bonassi und Fenech diese Aussage wieder auf und bestätigten nochmals, dass der Effekt des Geschlechtes und des Alters einen signifikanten Unterschied bewirken kann (Fenech und Bonassi, 2011). Ähnliche Resultate erzielten auch Coşkun et al., die einen Effekt des Alters auf Ergebnisse des MNT zeigten. PBL von 71 gesunden Probanden mit gleichem sozioökonomischen Hintergrund, die in den letzten sechs Monaten keiner Röntgenuntersuchung ausgesetzt waren und keine Landwirtschaft betrieben, wurden dazu untersucht. Die MN-Frequenz der älteren Gruppe war annähernd 7-fach höher als die der jüngeren Gruppe (Coşkun et al. 2013).

Wie auch in vorliegender Arbeit, belegten weitere Studien (Norppa et al. 2003, Jones et al. 2011, Costa et al. 2011), dass induzierte zytogenetische Schäden mit dem Geschlecht bzw. dem Alter korrelierten.

Fenech und Morley werteten nicht nur die Spontanraten in der bereits weiter oben erwähnten Studie aus, sondern bestrahlten die Lymphozyten der Probanden zusätzlich *in-vitro* und fügten das Zytostatikum Mytomycin C hinzu. Nach der Behandlung zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen Alter der Probanden und Bildung von MN (Fenech und Morley 1985 (b)).

Um das Ausmaß genetischer Schäden bei Atomkraftwerkern zu bestimmen, verglichen Hadjidekova et al. mittels MNT die PBL von 133 Atomkraftwerkern mit einer Kontrollgruppe von 39 nicht exponierten Spendern. In ihrer Analyse untersuchten sie, wie auch in vorliegender Arbeit, den Zusammenhang der biologischen Variablen Geschlecht oder Alter der Probanden mit der Ausbeute an induzierten zytogenetischen Schäden. Die Arbeiter zeigten einen signifikanten Anstieg der MN-Frequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe. Während das Alter eine signifikante Korrelation mit der MN-Frequenz zeigte, konnte kein Zusammenhang zwischen der MN-Frequenz und dem Geschlecht festgestellt werden (Hadjidekova et al. 2003).

Gentile et al. untersuchten den genotoxischen Effekt von verschiedenen Agrochemikalien, denen Landwirte berufsbedingt ausgesetzt sind. Dazu evaluierten sie die PBL von 30

Blutproben mittels MNT. 20 Spender zählten zur exponierten Gruppe, 10 Spender zur Kontrollgruppe. Sie stellten statistisch signifikante Unterschiede bezogen auf die MN-Frequenz ($p < 0,0005$) zwischen beiden Gruppen fest. Der Pearson-Korrelationstest wies einen positiven Zusammenhang (Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0,27$, $p < 0,05$) zwischen Alter und MN-Frequenz in der exponierten Population auf (Gentile et al. 2012).

Der in dieser Arbeit beschriebene geschlechtsabhängige Unterschied war zu allen drei analysierten Zeitpunkten (vor, während und nach RCT) statistisch signifikant für die Ausbeute an MN bei Frauen. Eine signifikante Zunahme bezüglich der Unterschiede in der NPB-Ausbeute wurde lediglich nach 21,6 Gy gefunden. Eine Erklärung für die höhere Ausbeute an zytogenetischen Schäden bei Frauen könnte sein, dass diese im Gegensatz zu Männern zwei X-Chromosomen haben, die häufiger im Rahmen der MN-Bildung verloren gehen (Norppa et al. 2003).

4.2.2 Chemotherapie-Dosis

Seit über 40 Jahren nimmt 5-FU eine zentrale Rolle in der Therapie des KRK ein (Heidelberger et al. 1957). Als Radiosensitizer verstärkt 5-FU beim RC die Effizienz einer RT (Minsky et al. 1992, Moertel 1994). Zur Inhibition von DNA-Synthese und Zellwachstum erhielten die Patienten eine 5-FU-Dauerinfusion. In der geprüften Behandlungsgruppe zeigten sich interindividuell starke Schwankungen des gemessenen 5-FU-Spiegels. Es konnte keine Korrelation der Ausbeute an DNA-Schäden nach Verabreichung des Zytostatikums in neoadjuvanter RCT mit der 5-FU-Konzentration im humanen Blut ermittelt werden. Zwar gibt es Daten zur Schädigung der DNA durch eine CT, es wurde bisher jedoch keine Korrelation zwischen der Konzentration des Zytostatikums und der Anzahl an verursachten zytogenetischen Schäden beschrieben (Parker und Cheng 1990, Woynarowski et al. 2000, Almeida et al. 2006, Hoskins und Scott Butler 2007, Virag et al. 2012).

Ladeira et al. untersuchten MN im Blut von medizinischem Personal, das mit 5-FU kontaminiert wurde im Vergleich zu einer nicht-exponierten Kontrollgruppe. Es wurden erhöhte MN-Ausbeuten bei dem exponierten Personal gefunden, jedoch konnte kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Kontamination und der Ausbeute an MN gezeigt werden.

Intravenös appliziertes 5-FU ist schlecht steuerbar und kann starken individuellen Schwankungen unterliegen (Findlay et al. 1996). Eine Erklärung dafür, dass 5-FU keinen

Einfluss auf die Anzahl an DNA-Schäden ausübt, könnte mit dem schnellen Abbau und der kurzen Plasmahalbwertszeit des 5-FU zusammenhängen, wodurch die Lymphozyten einer nur sehr kurzen Exposition unterliegen. Zudem wird 5-FU hauptsächlich von schnell proliferierenden Zellen, wie Tumorzellen, aufgenommen, während Lymphozyten im Blutstrom meist in der G₀-Phase vorliegen.

Ein weiterer möglicher Faktor, der gegen eine Korrelation spricht, ist die neoadjuvante Kombinationstherapie, bestehend aus RT und CT. Eine Differenzierung zwischen RT- und CT-induzierten DNA-Schäden ist mit den angewandten zytogenetischen Untersuchungen nicht möglich. Die RT scheint insgesamt einen größeren zytogenetischen Schadenseffekt auf die Lymphozyten zu haben als die CT (Bilban-Jakopin und Bilban, 2001, Sala-Trepat et al. 1990, Rigaud et al. 1990).

Daraus lässt schließen, dass sich die CT-Konzentrationsschwankungen, wie sie im klinischen Einsatz im Rahmen einer präoperativen RCT auftraten (siehe 3.2.3), vermutlich nicht als Ursache unterschiedlicher Ausbeuten an DNA-Schäden nachweisen lassen.

4.2.3 Art der Chemotherapie und Vergleich des zytogenetischen Schadens in Therapiearm A und B

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Schäden vor, während und nach abgeschlossener neoadjuvanter RCT gemessen. Während in Therapiearm A (Kontrollarm der CAO/ARO/AIO-04-Studie und TransValid-Studie A) nach dem 5-FU-Monotherapie-Regime behandelt wurde, wurde in Therapiearm B (Prüfarm der CAO/ARO/AIO-04-Studie und TransValid-Studie B) nach dem FOLFOX-Schema, einer Kombination aus 5-FU und Oxaliplatin parallel zur RT, therapiert. Im Vergleich zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Ausbeute des zytogenetischen Schadens. Die Daten dieser Arbeit korrelieren mit den Daten einer Doktorarbeit aus der eigenen Abteilung (Hennies 2010), bei der die Blutproben von einem kleineren Patientenkollektiv (24 Probanden) ausgewertet und beide Therapiearme miteinander verglichen wurden. Dass sowohl 5-FU als auch Oxaliplatin zytogenetische Schäden verursachen, zeigten andere Arbeiten (Parker und Cheng 1990, Woynarowski et al. 2000, Almeida et al. 2006, Hoskins und Scott Butler 2007, Virag et al. 2012). Allerdings scheint bei einer Kombinationsbehandlung der Effekt der Strahlenwirkung zu überwiegen, was auch bei Patienten mit anderen Tumoren gezeigt wurde (Rigaud et al. 1990). Rigaud et al. rekrutierten ein Kollektiv von 21 Mammakarzinom-Patientinnen, die eine RT, eine CT (5-FU, Adriamycin

und Cyclophosphamid) oder beides erhielten und bewerteten instabile Chromosomenaberrationen in PBL. Die RT verursachte instabile Chromosomenaberrationen wie dizentrische Chromosomen oder azentrische Fragmente, während die alleinige CT derartige Aberrationen nicht hervorrief (Rigaud et al. 1990). Milosevic-Djordjevic et al. untersuchten therapieinduzierte DNA-Schäden in PBL von Mammakarzinom-Patientinnen, die entweder eine RT oder eine RCT erhielten. Der Effekt der alleinigen RT und der Effekt der RT in Kombination mit der CT zeigten einen signifikanten Anstieg der MN-Frequenz. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Therapiegruppen bestand jedoch nicht, so dass der zytogenetische Schaden nicht auf einen synergistischen Effekt (Milosevic-Djordjevic et al. 2011), sondern auf die RT alleine zurückzuführen war. Bilban-Jakopin und Bilban untersuchten 30 Patienten, die an Morbus Hodgkin erkrankt waren. Gruppe I erhielt eine CT mit MOPP/ABV (Mechlorethamin, Vincristin, Procarbazin, Prednison/Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastin), Gruppe II erhielt CT und RT, Gruppe III bildete die gesunde Kontrollgruppe. Vor der Behandlung wiesen Patienten aus Gruppe I und II keine höhere Anzahl an chromosomalen Schäden auf als Patienten der Kontrollgruppe III. Nach kompletter Behandlung zeigten Gruppe I und II einen signifikanten Anstieg der Frequenz von Chromosomenaberrationen, MN und Schwesterchromatidaustausch im Vergleich zu Gruppe III. Bilban-Jakopin und Bilban stellten einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Gruppe I und II, bezogen auf MN ($p < 0,005$) und Chromosomenaberration ($p < 0,005$), fest. Patienten, die RT und CT erhielten, wiesen eine signifikant größere Zunahme von Chromosomenaberrationen und MN auf als Patienten, die nur mit CT behandelt wurden (Bilban-Jakopin und Bilban 2001).

4.2.4 PTV-Größe

In dieser Arbeit wurden im Rahmen einer großen prospektiv randomisierten klinischen Phase III-Studie („Präoperative RCT und adjuvante CT mit 5-FU plus Oxaliplatin im Vergleich zu einer präoperativen RCT und adjuvanten CT mit 5-FU beim lokal fortgeschrittenen RC im UICC-Stadium II und III“) und der einarmigen, nicht randomisierten TransValid-Studie A/B erstmals die Ergebnisse des MNT bezüglich seines Zusammenhangs mit der PTV-Größe geprüft. Anhand der MNT-Ergebnisse und der PTV-Größen konnte in vorliegender Untersuchung gezeigt werden, dass die neoadjuvante RCT in der DNA der Lymphozyten der

Patienten einen zytogenetischen Schaden erzeugt, der statistisch signifikant von der Größe des PTV abhängt.

Nach einer Recherche in „Pubmed“ mit der Eingabe „planning target volume; breast/rectal cancer“ existierten in der Literatur keine unmittelbar vergleichbaren Arbeiten, so dass hier naheliegende Themen aufgegriffen werden:

Hartel et al. bewiesen 2010, dass unterschiedliche Bestrahlungsqualitäten und Größen von Bestrahlungsvolumina zytogenetische Schäden induzieren können. Die Studie analysierte Chromosomenaberrationen mittels Giemsa-Färbung und FISH-Analyse in PBL von 20 Patienten mit Prostatakarzinom. Die Patienten wurden entweder mit einem Kohlenstoffionen-Boost, gefolgt von einer IMRT, oder mit alleiniger IMRT behandelt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der RT erfasste man die Chromosomenaberrationen. Zur Bestimmung der individuellen Strahlenempfindlichkeit wurde jedem Patienten vor Beginn der RT eine Blutprobe entnommen, die *in-vitro* bestrahlt wurde. Zusätzlich wurden *in-vitro*-Dosiseffektcurven von Röntgenstrahlen und Kohlenstoffionen verschiedener Energien ermittelt. Die Ausbeute an zytogenetischen Schäden *in-vivo* - im Sinne von Chromosomenaberrationen - stieg während der RT an. Trotz vergleichbarer Zielvolumina war die Rate zytogenetischer Schäden niedriger bei Kohlenstoffionen-Boost, gefolgt von einer IMRT als bei alleiniger IMRT. Die Ausprägung der Schäden nahm mit größeren Zielvolumina zu. Die Autoren schlossen daraus, dass die insgesamt reduzierte Dosis am Normalgewebe bei Behandlung mit Kohlenstoffionen-Boost die geringeren Ausbeuten an Aberrationen bedingte (Hartel et al. 2010).

Trotz unterschiedlicher verwendeter Strahlenqualitäten spiegeln sich die Ergebnisse dieser Arbeit teilweise in den Daten von Hartel et al. wider. Bei größeren Zielvolumina lag bei Hartel et al. eine größere Ausbeute an zytogenetischen Schäden in Form von Chromosomenaberrationen vor. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein Anstieg der Rate an zytogenetischen Schäden in Form von MN und NPB mit zunehmender PTV-Größe.

In einer Folgearbeit von Hartel et al., veröffentlicht durch Pignalosa et al., gab es drei Jahre später keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Ausbeute an Chromosomenaberrationen bei Prostatakarzinom-Patienten, die mit IMRT oder kombinierter Therapie (IMRT/Kohlenstoff) behandelt wurden bei vergleichbaren Zielvolumina (Pignalosa et al. 2013). Neben Hartel et al. gibt es andere Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Größe des Bestrahlungsvolumens und der Rate an zytogenetischen Schäden untersuchten, allerdings waren die Patientenzahlen klein, die Studien schlossen multiple Tumorentitäten

ein oder die Unterschiede der Bestrahlungsvolumina und –dosen differierten sehr voneinander (Werbrouck et al. 2013).

Durante et al. fanden 1999 in ihrer Arbeit bei 30 Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten eine Abhängigkeit von der Ausbeute an Chromosomenaberrationen von der Feldgröße (Durante et al. 1999). Anhand bestrahlter Ösophagus-Karzinome wurde gezeigt, dass ein Teil an zytogenetischen Schäden mit dem klinischen Zielvolumen korrelierte (Durante et al. 1999, Yamada et al. 2000). Lee et al. untersuchten 2004 die Zunahme der chromosomalen Aberrations-Frequenz bei Lungen-Karzinomen vor, während und nach Kohlenstoffionen-Therapie. Dazu werteten sie nach Blutentnahme zu den drei definierten Zeitpunkten die PBL von 22 Patienten mittels FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)-Analyse und prämaturer Chromosomen-Kondensation (premature chromosome condensation - PCC)-Technik aus. Es resultierte eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl induzierter chromosomaler Aberrationen in den PBL und der Größe des Bestrahlungsfeldes. Eine schwache Korrelation zeigte sich bei der Anzahl von weißen Blutzellen und Lymphozyten während der Behandlung. Lee et al. fanden in Ihrer Arbeit eine Abhängigkeit von chromosomalen Aberrationen und dem klinischen Zielvolumen nach RT, was möglicherweise mit einer zunehmenden Anzahl von Lymphknoten im Bestrahlungsfeld zusammenhängt (Lee et al. 2004). Die Auswirkungen der RT auf Lymphknoten wurden mehrfach diskutiert: Die bestrahlten Lymphknoten im Zielvolumen wurden als eine weitere Einflussvariable identifiziert (Lee et al. 2004, D'Alesio et al. 2003). D'Alesio et al. berichteten 2003, dass bestrahlte Lymphknoten die Hauptdeterminanten für die Ausbeute an chromosomalen Aberrationen in den PBL von Mamma-Karzinom-Patientinnen sind (D'Alesio et al. 2003).

Entgegen der Arbeit von Lee et al. stellten d'Alesio et al. keine Korrelation von chromosomalen Aberrationen in PBL und der Größe des Bestrahlungsfeldes fest. Sie berichteten weiter, dass die Rate chromosomaler Aberrationen bei Behandlungsabschluss signifikant höher war, wenn keine chirurgische Lymphknotenausräumung stattfand, verglichen mit Patientinnen, bei denen eine Dissektion von ≥ 10 Lymphknoten durchgeführt wurden. Die Forschergruppe schloss daraus, dass der induzierte zytogenetische Schaden von der Menge der strahlenexponierten residuellen Lymphknoten abhängt, wovon auch Lee et al. ein Jahr später ausgingen (d'Alesio et al. 2003, Lee et al. 2004). Lymphozyten zirkulieren zwischen Blut und lymphatischen Gewebe. Nach operativer Entnahme von potentiell exponierten Lymphknoten kann somit eine niedrigere Rate an Zellen und damit eine

niedrigere Rate in der CAA gefunden werden. Im Gegensatz zur Untersuchung von d'Alesio et al. verfolgte das CAO/ARO/AIO 04-Studienprotokoll das Konzept der neoadjuvanten RCT, so dass keine chirurgische Lymphknotenentfernung vor RCT stattfand. Die anatomische Definition der Feldgrenzen wurde streng eingehalten.

In einer Studie mit insgesamt 9 Patienten stellten Gershkevitsh et al. fest, dass die Menge an zytogenetischen Schäden in Form von dizentrischen Chromosomenaberrationen mit dem PTV und der durchschnittlichen Knochenmarkdosis (gemessen in Gy) anstieg. Sie untersuchten als mögliche Risikofaktoren für RT-induzierte Leukämien die Relation zwischen akkumulierter Knochenmarkdosis und der Häufigkeit instabiler Chromosomenaberrationen in PBL von Patienten, die sich einer RT für ein Prostatakarzinom unterzogen. Zum Vergleich wurden auch Patientinnen mit Endometrium-Karzinom in die Studie eingeschlossen. Die Ausbeute an dizentrischen Aberrationen bei Prostatakarzinom-Patienten korrelierte mit dem PTV und der durchschnittlichen Knochenmarkdosis (Gershkevitsh et al. 2002). In der vorliegenden Untersuchung wurde das CTV des Beckens bei allen Patienten anatomisch homogen abgegrenzt. Dieses umfasste als Bestrahlungsvolumen die Sakralhöhle, die dorsalen Anteile der Blase und Prostata bzw. Vagina sowie die präsakralen und iliakal-kommunen Lymphknoten bis zum Promontorium. Das PTV beinhaltete das CTV mit einem 10 mm Sicherheitsabstand. Daher wird die Größe des PTV nicht unmittelbar von der Tumorgröße, Tumorlokalisierung oder Lymphknotenstatus, sondern von der individuellen Anatomie jedes Patienten bestimmt. Es gibt nur wenige Daten über die interindividuelle Variabilität der PTV-Größe. Frühere Untersuchungen fanden eine Korrelation von Geschlecht und mesorektalem Volumen, was zur PTV - Größe beisteuert (Allen und Blunt 2007). In unserer Abteilung konnte bereits gezeigt werden, dass es einen Effekt der Körpergröße und des Gewichts auf die PTV-Größe gibt, während das Geschlecht dabei keine Rolle zu spielen scheint. Diese Arbeit demonstriert, dass die PTV-Größe signifikant mit dem DNA-Schaden der zirkulierenden PBL korreliert.

4.3 Zytogenetische Schäden und klinische Akuttoxizität bei neoadjuvanter Radiochemotherapie

In der vorliegenden Untersuchung konnten die akuten Organtoxizitäten bei 133 mit einer neoadjuvanten Radiochemotherapie behandelten RC-Patienten nach den CTCAE-Kriterien erfasst werden. Eine Korrelation zwischen der Ausbeute an MN und dem Grad der

aufgetretenen Akuttoxizität in den relevanten Organsystemen Haut, Blase, Dünndarm und Enddarm sowie der Gesamtoxizität wurde analysiert. Die Korrelationsanalyse zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang für die Akuttoxizität im Bereich aller relevanten Organsysteme. Auch für die Gesamtoxizität zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation (siehe 3.3).

Frühere Studien bestätigen diese Ergebnisse zu gewissen Teilen. 1998 konnten Rached et al. keinen Zusammenhang zwischen zytogenetischen Schäden im MNT und klinischer Akuttoxizität nachweisen. Sie verglichen die MN-Frequenz der PBL nach *in-vitro*-Bestrahlung (4 Gy) bei 45 Patienten. 15 Patienten unterbrachen die RT aufgrund von schweren Akutreaktionen, 15 Patienten erhielten eine RT ohne akute Reaktionen, und 15 gesunde Spender zählten zur Kontrollgruppe. Die Blutentnahmen erfolgten vor und am Ende der RT bei Patienten ohne Akutreaktionen; bei Patienten, die an Nebenwirkungen litten, war der Zeitpunkt der Blutentnahme der Therapie-Abbruch. Die durchschnittliche Strahlen-induzierte Ausbeute an MN war bei den Studiengruppen signifikant höher als bei der Kontrollgruppe. Eine Korrelation zwischen der MN-Ausbeute und dem Auftreten von akuten Nebenwirkungen wurde nicht nachgewiesen (Rached et al. 1998).

Mit dem Vergleich der individuellen Strahlenempfindlichkeit von *in-vitro* und *in-vivo*-Analysen beschäftigte sich eine Studie von Brzozowska (Brzozowska et al. 2012). Zu den Studienprobanden zählten 50 Prostatakarzinom-Patienten, von denen die Hälfte nach RT schwere Nebenwirkungen zeigte, und 23 gesunde männliche Spender. Alle Blutproben wurden Gamma-Strahlung (0,5 Gy oder 1 Gy) ausgesetzt. Mit unterschiedlichen Testverfahren wurden diese nach Bestrahlung auf erste Anzeichen von zytogenetischen Schäden wie Doppelstrangbrüche und Reparaturmechanismen (Gamma-H2AX-Test) sowie Apoptose (Annexin V-Test) und Chromosomenaberrationen (G2-Test) untersucht. Die Studie zeigte keine evidente Korrelation zwischen der Strahlensensibilität auf zellulärer und klinischer Ebene in den Lymphozyten von Prostatakarzinomen in Hinblick auf alle angewandten *in-vitro*-Tests.

Andere Untersucher beschrieben aber auch Korrelationen von zytogenetischen Schäden und klinischen Akuttoxizitäten. Widel et al. untersuchten 2003 mittels MNT 55 Blutproben von Patientinnen mit fortgeschrittenem Cervixkarzinom vor Start der RT. Diese erhielten eine Tele- und Brachytherapie. Akut- und Spätnebenwirkungen wurden ermittelt und korreliert mit der MN-Frequenz in den BNL nach *in-vitro*-Radiatio von 4 Gy. Die Forscher beobachteten eine große interindividuelle Variabilität der Strahlen-induzierten MN-Ausbeute in den

Lymphozyten. Blutproben von Patientinnen, die unter Akut- und/oder Spätnebenwirkungen litten, zeigten eine signifikant höhere durchschnittliche MN-Ausbeute nach 4 Gy *in-vitro*-Bestrahlung als Patientinnen ohne Nebenwirkungen. Eine signifikante Korrelation zeigte sich zwischen der Menge an MN nach *in-vitro*-Radiatio und der Schwere der Akut- und Spätreaktionen. Aufgrund der zu großen Übereinstimmung der MN-Ausbeuten bei Patienten mit niedriggradigen und hochgradigen Toxizitäten empfehlen Widel et al. den MNT in der angewandten Form nicht für die klinische Routineanwendung (Widel et al. 2003).

Borgmann et al. testeten, ob die chromosomale Strahlenempfindlichkeit von *in-vitro* bestrahlten Lymphozyten prädiktiv sei für das Risiko auftretender Akuttoxizitäten bei RT. Dazu stellten sie zwei prospektive Untersuchungen auf: Untersuchung A schloss 51 Patienten mit unterschiedlichen Tumorlokalisationen ein, Untersuchung B schloss 87 Mammakarzinom-Patientinnen ein. Sie bewerteten die auftretenden Akutreaktionen mittels RTOG-Score. Alle Patienten erhielten eine kurative RT. A-Patienten wurden mit durchschnittlich 55 Gy +/- Tumorboost von 11 Gy bestrahlt. B-Patienten wurden mit durchschnittlich 50,4 Gy +/- Tumorboost von 10 Gy bestrahlt. Borgmann et al. bestrahlten die Blutproben entweder mit 3 oder 6 Gy *in-vitro*, um die individuelle Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten zu bestimmen, und zählten die chromosomalen Verluste aus. Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass Studie A mit 75% ein typisches Spektrum an Akutreaktionen aufwies, Studie B mit 53% Akutreaktionen von Grad 2-3. Eine erhebliche Variation charakterisierte die individuelle Strahlenempfindlichkeit in beiden Studien-Gruppen. Man fand heraus, dass der Teil der Patienten mit Grad 2-3 Akutreaktionen mit steigender individueller Strahlenempfindlichkeit bei 6 Gy anstieg. Borgmann et al. schlussfolgerten daraus, dass die bei 6 Gy bestimmte individuelle Strahlenempfindlichkeit ein guter Prädiktor für das Risiko von Akutreaktionen bei kurativer RT sei (Borgmann et al. 2008).

Vor Therapiebeginn evaluierte eine weitere Arbeitsgruppe die zytogenetische Reaktion auf *in-vitro*-Bestrahlung mit dem MNT. Lee et al. untersuchten dabei die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen auftretenden Nebenwirkungen und der Ausbeute an MN besteht. Sie prüften, ob die Strahlensensibilität der Lymphozyten mit der Morbidität des Beckens nach RT korrelierte. Dazu führten sie vor Beginn der RT den MNT bei 38 Patienten mit Prostatakarzinom durch, indem sie die PBL mit 1-4 Gy *in-vitro* bestrahlten. Die Erfassung der Nebenwirkungen erfolgte nach durchschnittlich 32,8 Monaten. Die Autoren fanden einen signifikanten Unterschied bezogen auf die MN-Ausbeute bei Patienten \leq Grad 1 Nebenwirkungen und Patienten \geq Grad 2 Nebenwirkungen. Die quantifizierbare, von der

Strahlendosis abhängige MN-Ausbeute erwies sich nach *in-vitro*-Bestrahlung als signifikante, prognostizierbare Einflussvariable für das Auftreten gastrointestinaler Störungen oder Beschwerden der Harn- und Geschlechtsorgane beim Prostatakarzinom nach RT des Beckens (Lee TK et al. 2003). In Anbetracht dieser kontroversen Datenlage zeigt sich, dass es noch nicht gelungen ist, einen einheitlichen, aussagekräftigen und prädiktiven Faktor bezüglich auftretender Nebenwirkungen zu etablieren, was die Ergebnisse unserer vorliegenden Analyse bestätigen.

4.4 Methodenkritik

Zuverlässigkeit und Sensitivität zeichnen den MNT (Kormos und Köteles 1988), der auf einfacher zytogenetischer Technik basiert (Countryman und Heddle 1976), aus. Trotz dieser positiven Eigenschaften kann der in dieser Arbeit angewandte MNT auch zu Fehleinschätzungen führen.

Aus organisatorischen Gründen war auf den Präparaten der Abnahmezeitpunkt der Blutprobe codiert, so dass der Zähler bereits vor Auswerten der OT hätte rückschließen können, mit welcher Strahlendosis der Patient behandelt worden war. Eine unbewusste oder gar bewusste Voreinschätzung bzw. Erwartungshaltung dem Präparat gegenüber, die die Zählung manipuliert, hätte daraus resultieren können. Diese teilweise fehlende Verblindung der Präparate könnte zu einer Verfälschung der Ergebnisse beigetragen haben. Dagegen spricht, dass nicht nur die Strahlendosis, sondern auch andere Faktoren die Ergebnisse des MNT beeinflussen, wie etwa Lebensalter und Geschlecht (Ishikawa et al. 2003, Fenech und Bonassi 2011), Lebensgewohnheiten (Fenech und Bonassi 2011), wie etwa Rauchen (Bonassi et al. 2003) und körperliche Anstrengung (Schiffle et al. 1997), aber auch Ernährungsgewohnheiten (Fenech und Rinaldi 1995, Fenech und Bonassi 2011) und Lagerungsbedingungen der Blutproben (Lee et al. 1999). Da die OT mit einer Patientenummer versehen waren, befand sich auf selbigen keine Dokumentation von Lebensalter und Geschlecht, was auf eine erfolgreiche Verblindung deutet. Zudem führte ein weiterer Auswerter Stichproben zur Verifikation der ausgezählten Daten durch. Um bei der lichtmikroskopischen Auswertung der Zytokinese-blockierten BNL einheitliche Ergebnisse zu erzielen, achteten „Zähler“ und „Prüfer“ stets auf dieselben Anforderungskriterien (Fenech 2000). So hatten beide Auswerter neben dem Lichtmikroskop die von Fenech in 2000 und 2003 veröffentlichten Paper als Vorlage. Diese zeigen in Form von schematischen Skizzen und Fotos die unterschiedlichen

Charakteristika der BNL und der MN (Fenech 2000, Fenech et al. 2003). Nur Zellen mit eindeutig zu identifizierenden Schäden in Form von MN und NPB wurden dabei berücksichtigt. Diese Aspekte belegen die Wertigkeit der mit dem MNT erhobenen Daten.

4.5 Ausblick

Die von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderte interdisziplinäre KFO 179 (Biological Basis of Individual Tumor Response in Patients with Rectal Cancer) untersuchte an der Universitätsmedizin Göttingen die molekularbiologischen Hintergründe individueller Therapie-Erfolge sowie die mit der Therapie vergesellschafteten Nebenwirkungen jedes einzelnen Patienten. Ziel dabei ist die Entwicklung einer individualisierten Tumorthherapie des RC. Zukünftig sollen Patienten mit Hilfe der in der Studie erworbenen Erkenntnisse von einem individuellen und somit verbesserten Therapiekonzept bei Minimierung von Nebenwirkungen profitieren können. Personalisierte Medizin mit Response- (Wirkung) und Toxizitäts-Scores (Nebenwirkungen) sollte eine adaptierte Therapie realisieren können. Dabei stehen die Erhöhung des Therapieerfolges und die Verbesserung der Lebensqualität im Fokus. Ein weiteres Ziel der KFO ist eine individuelle Prognose von Tumoransprechen und Toxizität, um die Zusammensetzung und Intensität der multimodalen Therapie ggf. zu adaptieren. Der in der vorliegenden Analyse angewandte MNT ist leicht durchzuführen und kann aufgrund der Praktikabilität möglicherweise in den Klinikalltag integriert werden. Mittels MNT wurde im Rahmen dieser Arbeit bestätigt, dass der Faktor Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf die Rate an MN und NPB ausübt. Außerdem wurde festgestellt, dass Patienten, deren PTV-Größe - anatomisch bedingt - volumenmäßig größer war, mehr *in-vivo*-induzierte DNA-Schäden aufwiesen. Die Beschreibung der PTV-Größe ist eine weitere Variable, die das Verständnis für die Anwendung des MNT bei angewandter *in-vivo*-Dosimetrie während der Bestrahlung verbessert. Der Einfluss biologischer und klinischer Faktoren wie Patientenalter, Chemotherapiespiegel im humanen Blut, Art der Chemotherapie und Akuttoxizitäten wurden in vorliegender Arbeit ebenfalls untersucht, zeigten jedoch keinerlei Korrelation zur MN- und NPB-Ausbeute. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Korrelation zwischen PTV-Größe während der Bestrahlung und Ausbeute an MN und NPB könnte in Zukunft ggf. dazu genutzt werden, die Therapie von Patienten individueller zu gestalten. Das Resultat dieser Analyse alleine bringt dem Patienten derzeit noch keinen direkten Benefit, da es im klinischen Alltag keine große Bedeutung hat.

Auch wenn der MNT u. a. durch klinische Praktikabilität besticht, so zeigt sich hier in vorliegender Analyse, bei teilweise kontroverser Datenlage in der Literatur, dass sich dieser alleine nicht als prädiktiver Indikator für das Auftreten von Nebenwirkungen eignet. In weiteren Forschungsbemühungen sollte nach besseren bzw. spezifischeren Methoden gesucht werden, die als prädiktive Faktoren angewendet werden können, um eine aussagekräftige Prognose der zu erwartenden Nebenwirkungen geben zu können. Zur Ermittlung eines Indikators für auftretende Nebenwirkungen bedarf es also weiterer Studien mit größeren Patientenkohorten. Neue Technologien, die häufig unter dem Schlagwort „Omiks“ zusammengefasst werden und systembiologische Untersuchungen könnten hierbei weiterführende Erkenntnisse bringen. Optimal wäre es, bereits vor Behandlungsbeginn eine valide Prognose bzgl. Tumoransprechen und Nebenwirkungen eines jeden Patienten vorhersagen zu können, um so die Therapie individualisieren und verbessern zu können.

5 Zusammenfassung

Eine neoadjuvante Radiochemotherapie als Standard der multimodalen Behandlung des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms verursacht DNA-Schäden, die in peripheren Blutlymphozyten (PBL) nachgewiesen werden können. Nach Akquisition von Blutproben wurden PBL zur Durchführung des Mikronukleustest (MNT) isoliert und kultiviert. Methodisch stellt der MNT dabei eine vergleichsweise einfache und schnelle Untersuchungsmethode zum Nachweis zytogenetischer Schäden *in-vivo* und *in-vitro* dar, was eine flächendeckende Umsetzung in der klinischen Routine realisierbar machen würde.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Analyse von 133 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom (UICC-Stadium II-IV), die sich einer neoadjuvanten Radiochemotherapie unterzogen hatten. Das Patientenkollektiv entstammte der prospektiv randomisierten CAO/ARO/AIO-04-Studie oder der TransValid-Studie A/B. Alle Patienten durchliefen zusätzlich zur Chemotherapie eine Bestrahlung (Gesamtdosis 50,4 Gy; 1,8 Gy/d). 78 Patienten wurden mit der 5-FU-Monotherapie (1. und 5. RT-Woche, 1000 mg/m²/d) behandelt. 55 Patienten erhielten gemäß FOLFOX-Schema eine kombinierte Chemotherapie aus 5-FU und Oxaliplatin (5-FU d 1-14 + d 22-35, 250 mg/m²/d; Oxaliplatin d 1,8,22,29, 50 mg/m²/d). Ein Vergleich der randomisierten Behandlungsgruppen in Bezug auf den zytogenetischen Schaden erfolgte mit der Untersuchung strahlensensibler Lymphozyten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Variablen Geschlecht, Alter, PTV (*planning target volume*), Art der Chemotherapie und 5-FU-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Strahlendosis auf die Ergebnisse des MNT untersucht. Auch eine mögliche Korrelation von Toxizität und zytogenetischen Schäden wurde untersucht. Die strahlensensiblen Lymphozyten dienten hierbei zur Darstellung der zytogenetischen Schäden. Die Probengewinnung, Isolation, Kultivierung sowie Auswertung der Lymphozyten mittels MNT nach *in-vivo*-Bestrahlung fand zu drei definierten Zeitpunkten (vor Behandlungsbeginn, nach 21,6 Gy und nach 50,4 Gy) statt.

Eine signifikante Zunahme chromosomaler Schädigungen durch die Bestrahlung in Abhängigkeit von der applizierten Strahlendosis konnte beobachtet werden. Bezugnehmend auf die Anzahl der zytogenetischen Schäden reagierten die Patienten interindividuell sehr unterschiedlich, wobei Frauen empfindlicher waren als Männer. Keine statistisch signifikante Korrelation mit der Anzahl an DNA-Schäden wurde für den Faktor Lebensalter oder für die

im humanen Blutplasma gemessene 5-FU-Konzentration gezeigt. Patienten der 5-FU-Monotherapie zeigten im Vergleich zu Patienten des FOLFOX-Regimes eine minimal geringere Zunahme des DNA-Schadens, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Des Weiteren zeigte die Korrelationsanalyse keinen statistisch signifikanten Zusammenhang für das Auftreten von Akuttoxizitäten der einzelnen Organsysteme und der Ausbeuten an MN bzw. NPB.

Erstmalig beschrieb die vorliegende Analyse, dass die neoadjuvante Radiochemotherapie DNA-Schäden, gemessen als MN und NPB, in den strahlensensiblen Lymphozyten verursacht, die statistisch signifikant von der PTV-Größe abhängen. Dieser Befund hat keinen direkten Einfluss auf Therapieentscheidungen, könnte aber zukünftig für Analysen im Rahmen des Strahlenschutzes von Interesse sein.

Obwohl sich im Fazit der MNT bei hoher statistischer Aussagekraft als klinisch praktikabel und gut durchzuführen erwies, überzeugte dieser alleine nicht als prädiktiver Indikator für das Auftreten von Nebenwirkungen. Um noch vor Behandlungsbeginn eine individuelle Prognose des Tumorsprechens und der auftretenden Nebenwirkungen abgeben zu können, bedarf es zukünftig weiterer Untersuchungen, die die Entwicklung spezifischer Methoden einschließen. Bessere Heilungschancen, reduzierte Nebenwirkungen und eine damit assoziierte Erhöhung der Lebensqualität stehen hier für den Patienten im Fokus.

6 Anhang: Tabellen 14 und 15

Tabelle 14: Zusammenfassung der PTV-Größe von allen Patienten

Patienten-ID	PTV [cm ³]	Patienten-ID	PTV [cm ³]
1055	1454,7	193	1970,8
168	1175,8	252	1674,3
1244	1547,6	335	1376,5
1232	1153,1	277	1536
317	1432,8	202	2563,4
1154	1226,5	1311	1531,8
324	1217,4	167	1688,4
1225	1561,1	1237	1099,5
162	1651,6	248	1392,5
398	1469	278	1164,2
281	1179,6	230	1763,6
694	1358,4	1212	1411,2
338	1270,7	383	1453,3
318	1459,3	1309	1507,8
1159	1154,4	1287	1545,3
308	1207,4	370	1322,5
172	1125,7	161	2137,3
709	1490,5	177	1418,8
1259	1532	389	1595,5
1268	1424	1222	1564,4
159	2117,2	173	1164,7
283	1442,5	378	1606,4
1063	1343,1	375	1574,3
301	1371,5	169	1112,8
881	1408,9	1292	1411,9
306	1729,9	1355	1265,1
275	1670,4	681	1907,6
353	1250,3	152	2015,1

Patienten-ID	PTV [cm³]	Patienten-ID	PTV [cm³]
570	1240,1	291	1273,5
1366	1350,8	391	1225
938	1456,6	1161	1414,7
1209	1694,3	1218	1581,5
654	1204,1	1228	1493,4
341	1504	367	1160,9
1235	1650,5	292	1232,4
1176	1199,7	703	1115
1356	1761,4	1282	2735,5
1276	1780,1	359	1459
1346	1434,3	151	1344,8
1208	1630,7	176	1456,1
1204	1681,3	358	1338,8
165	1036,8	158	1916,1
323	1458,4	295	1211,8
1257	1148,1	286	1398,7
1236	1195,9	476	2201,8
1206	1469,1	528	1370,2
1285	1805,2	342	1298
298	1253,3	1272	1207,2
304	1434,5	300	1009,6
1238	1414	287	1536,7
843	1357,2	309	1260,5
360	1394,6	293	1439,3
302	1529,7	160	1381,6
733	1367	1293	1373,2
1291	1747,1	276	2449,7
614	1198,2	155	1783
279	1407,4	229	1379,5
488	1177,4	651	1978
659	1547,6	871	1434,2

Patienten-ID	PTV [cm ³]	Patienten-ID	PTV [cm ³]
499	1291,6	1348	1401
742	1247,1	164	1110,1
385	1326,2	288	1118,4
393	1550,2	340	1290,6
311	1544,7	1201	1592,7
327	1815,5	1224	1590,3
315	1168,2	382	1059,3
170	998,6		

Tabelle 15: Grad der Akuttoxizität aller Studienpatienten nach CTCAE-Kriterien

Patient	Akuttoxizität Haut	Akuttoxizität Blase	Akuttoxizität Dünndarm	Akuttoxizität Enddarm	Sonstige Toxizität	Höchstgradige Akuttoxizität
1	1	0	0	1		1
2	1	0	4	1		4
3	0	0	0	0		0
4	1	0	2	1		2
5	1	0	1	0		1
6	1	1	0	2		2
7	2	1	1	1		2
8	0	0	0	1		1
9	2	0	1	0		2
10	1	1	1	2		2
11	2	1	4	3		4
12	2	0	1	3		3
13	0	0	0	3		3
14	2	1	2	2		2
15	2	1	2	3		3
16	3	0	1	3		3
17	3	0	0	1		3
18	0	0	0	2		2
19	1	1	1	1		1
20	1	1	0	1		1
21	1	2	0	3		3
22	3	0	0	3		3
23	0	1	0	2		2
24	1	1	0	1		1
25	3	4	2	2		4
26	0	0	0	2		1
27	1	1	1	3		3
28	1	1	1	3		3
29	0	0	0	1		1

Patient	Akuttoxizität Haut	Akuttoxizität Blase	Akuttoxizität Dünndarm	Akuttoxizität Enddarm	Sonstige Toxizität	Höchstgradige Akuttoxizität
30	0	0	0	1		1
31	1	1	0	1		1
32	0	3	0	1		3
33	0	1	0	0		1
34	0	0	1	0		1
35	0	1	1	3		3
36	1	0	0	1		1
37	0	3	1	3		3
38	1	2	0	2		2
39	0	0	2	1		2
40	0	0	2	2		2
41	3	2	1	2		3
42	3	0	1	2		3
43	2	0	2	2		2
44	2	1	0	1		2
45	1	0	0	2		2
46	2	0	0	3		3
47	2	1	0	1		2
48	0	0	1	2		2
49	1	1	1	1		1
50	2	1	3	1		3
51	0	0	0	1		1
52	1	1	0	2		2
53	3	0	1	4		4
54	1	0	1	1		1
55	1	3	0	1		3
56	1	0	0	0		1
57	1	1	0	1		1
58	2	1	3	1		3
59	0	0	0	0		0
60	1	0	1	1		1
61	1	0	1	1		1
62	2	1	4	4		4
63	1	1	0	1		1
64	2	1	1	1		2
65	1	0	0	1		1
66	1	1	0	1		1
67	2	0	0	1		2
68	1	0	1	0		1
69	1	1	2	2		2
70	0	1	0	2		2
71	1	0	1	2		2
72	1	1	0	2		2
73	1	0	1	0	Stationäre Aufnahme wg AZ ↓h	3

Patient	Akuttoxizität Haut	Akuttoxizität Blase	Akuttoxizität Dünndarm	Akuttoxizität Enddarm	Sonstige Toxizität	Höchstgradige Akuttoxizität
74	1	1	1	2		2
75	1	0	1	1		1
76	1	1	1	1		1
77	0	0	1	1		1
78	1	3	1	3		3
79	0	2	2	2		2
80	2	1	0	2		2
81	0	0	1	1		1
82	0	0	0	1		1
83	0	0	1	1		1
84	3	1	0	1		3
85	1	1	3	1		3
86	1	0	2	3		3
87	0	0	0	0		0
88	0	0	2	2		2
89	0	1	3	1		3
90	0	1	0	3		3
91	3	1	0	1		1
92	0	1	1	1		1
93	0	1	0	0		1
94	3	0	1	0		3
95	0	2	1	1		2
96	1	1	0	0		1
97	0	0	2	2		2
98	1	0	2	1		2
99	2	0	2	2		2
100	2	2	2	2		2
101	0	1	1	1		1
102	0	1	1	1		1
103	0	0	0	0		0
104	-	-	-	-	Patient erhielt keine Therapie	-
105	0	0	1	1		1
106	1	1	1	1		1
107	1	1	2	2		2
108	0	0	1	1		1
109	0	0	0	0		1
110	0	1	1	1		1
111	1	1	1	1		1
112	1	2	2	2		2
113	0	1	1	1		1
114	0	1	1	1		1
115	1	1	1	1		1
116	1	0	0	1		1

Patient	Akuttoxizität Haut	Akuttoxizität Blase	Akuttoxizität Dünndarm	Akuttoxizität Enddarm	Sonstige Toxizität	Höchstgradige Akuttoxizität
117	2	1	1	1		2
118	0	0	1	0		1
119	0	1	1	1		1
120	0	0	0	0		0
121	0	0	0	0		0
122	1	0	1	1		1
123	1	2	1	1		2
124	0	1	3	3		3
125	1	2	2	2		2
126	1	1	2	2		2
127	2	0	1	1		2
128	0	1	1	1		1
129	2	2	1	1		1
130	1	0	1	1		1
131	0	0	1	1		1
132	0	0	0	0		0
133	2	1	1	3		3
134	1	0	1	1		1

7 Literaturverzeichnis

Aktories K, Unger C: Mittel zur Behandlung von Tumoren- Tumorchemotherapie. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. Auflage; Elsevier, München 2009, 883-966

Allen SD Gada V, Blunt DM (2007): Variation of mesorectal volume with abdominal fat volume in patients with rectal carcinoma: assessment with MRI. *Br J Radiol* 80, 242-247

Almeida GM, Duarte TL, Steward WP, Jones GD (2006): Detection of oxaliplatin-induced DNA crosslinks *in vitro* and in cancer patients using the alkaline comet assay. *DNA Repair (Amst)* 5, 219-225

Barale R, Chelotti L, Davini T, Del Ry S, Andreassi MG, Ballardini M, Bulleri M, He J, Baldacci S, Di Pede F, Gemignani F, Landi S. (1998): Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age and lifestyle. *Environ Mol Mutagen* 31:228-42

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

Bilban-Jakopin C, Bilban M (2001): Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on circulating lymphocytes in patients with Hodgkin's disease. *Mutat Res* 497, 81-88

Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S (2001): HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen.* 37, 31-45

Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin YP, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Fenech M; HUMN collaborative group (2003): Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res.* 543, 155-66

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

Borgmann K, Hoeller U, Nowack S, Bernhard M, Röper B, Brackrock S, Petersen C., Szymczak S, Ziegler A, Feyer P (2008): Individual radiosensitivity measured with

lymphocytes may predict the risk of acute reaction after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71, 256-64

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, 405-13

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

CCCG (2001): Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8507 patients from 22 randomised trials. *Lancet* 358, 1291-1304

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

Coşkun M, Cayır A, Coşkun M, Tok H. (2013): Evaluation of background DNA damage in a Turkish population measured by means of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutat Res.* 757, 23-7

Costa C, Silva S, Neves J, Coelho P, Costa S, Laffon B, Snawder J, Teixeira JP (2011): Micronucleus frequencies in lymphocytes and reticulocytes in a pesticide-exposed population in Portugal. *J Toxicol Environ health A.* 74, 960-70

Countryman PI, Heddle JA (1976): The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 41, 321-32

Cox JD, Stetz J, Pajak TF (1995): Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31, 1341-1346

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fenech M, Bonassi S (2011): The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 26, 43-9

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

Fenech M, Neville S, Rinaldi J (1994): Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutat Res* 313, 203-7

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

Findlay MP, Raynaud F, Cunningham D, Iveson A, Collins DJ, Leach MO (1996): Measurement of plasma 5-fluorouracil by high-performance liquid chromatography with comparison of results to tissue drug levels observed using *in vivo* ¹⁹F magnetic resonance spectroscopy in patients on a protracted venous infusion with or without interferon-alpha. *Ann Oncol* 7, 47-53

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

Fuchs CS, Ggiovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Willett WC (1999): Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med* 340, 169-176

Fuchs R, Guggenberger D, Trautwein C: Diagnostik und Therapie gastrointestinaler Tumore 2011/2012. 20. Auflage; Nora-Verlag, Stolberg 2011

Gentile N, Mañas F, Bosch B, Peralta L, Gorla N, Aiassa D (2012): Micronucleus assay as a biomarker of genotoxicity in the occupational exposure to agrochemicals in rural workers. *Bull Environ Contam Toxicol*. 88, 816-22

Gérard JP, Conroy T, Bonnetain F, Bouché O, Chapet O, Closon-Dejardin MT, Untereiner M, Leduc B, Francois E, Maurel J (2006): Preoperative radiotherapy with or without concurrent

fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *J Clin Oncol* 24, 4620-4625

Gershkevitsh E, Hildebrandt G, Wolf U, Kamprad F, Realo E, Trott KR (2002): Chromosomal aberration in peripheral lymphocytes and dose of the active bone marrow in radiotherapy of prostate cancer. *Strahlenther Onkol* 178, 36-42

Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C, Füzesi L, Langer C, Becker H, Liersch T (2005): Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol*. 9, 1826-38

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

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

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

Hadjidekova, VB, Bulanova, M; Bonassi, S, Neri M (2003): Micronucleus frequency is increased in peripheral blood lymphocytes of nuclear power plant workers. *Radiat Res* 160, 684-90

Hahn J, Schmidt H: Erkrankungen des Dünn- und Dickdarms. In: Baenkler HW, Goldschmidt H, Hahn JM, Hinterseer M, Knez A, Lafrenz M, Möhling M, Pfeiffer AFH, Schmidt HHJ, Schmid M, Splanger J, Voll RE, Witzens-Harig M, Zidek W (Hrsg.): *Kurzlehrbuch Innere Medizin*. 3. Auflage, Thieme, Stuttgart, New York 2015, 286

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

Havenga K, Enker WE, McDermott K, Cohen AM, Minsky BD, Guillem J (1996): Male and female sexual and urinary function after total mesorectal excision with autonomic nerve preservation for carcinoma of the rectum. *J Am Coll Surg* 182, 495-502

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

Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, Schnitzer RJ, Plevin E, Scheiner J (1957): Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 179, 663-6

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

Hermann RM, Rave-Fränk M, Pradier O (2008): Combining radiation with oxaliplatin: a review of experimental results. *Cancer Radiother.* 12, 61-67

Herrmann T, Baumann B (1997): Wirkung ionisierender Strahlung in Chemie und Biochemie. In: Klinische Strahlenbiologie, Gustav Fischer, Jena. 1997, 24

Herrmann T, Petersen S, Hellmich G, Baumann M, Ludwig K (1999): Delayed toxicity of brief preoperative irradiation and risk-adjusted postoperative radiotherapy of operative rectal carcinoma. Results of a randomized prospective study. *Strahlenther Onkol* 175, 430-6

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

Hoskins J, Scott Butler J (2007): Evidence for distinct DNA- and RNA-based mechanisms of 5-fluorouracil cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 24, 861-870

Ishikawa H, Tian Y, Yamauchi T. (2003): Influence of gender, age and lifestyle factors on micronuclei frequency in healthy Japanese populations *J Occup Health.* 45, 179-81

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011): Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 61, 69-90

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

Jones K, York T, Juusola J, Ferreira-Gonzalez A, Maes H, Jackson-Cook C (2011): Genetic and environmental influences on spontaneous micronuclei frequencies in children and adults: a twin study. *Mutagenesis* 26, 745-752

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

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

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

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

Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI, Saarbrücken 2006

Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI, Berlin 2012

Kormos C, Köteles GJ (1988): Micronuclei in X-irradiated human lymphocytes. *Mutat Res.* 199(1), 31-5

Koukourakis GV (2012): Role of radiation therapy in neoadjuvant era in patients with locally advanced rectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 4, 230-237

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

Ladeira C, Viegas S, Pádua M, Gomes M, Carolino E, Gomes MC, Brito M (2014): Assessment of genotoxic effects in nurses handling cytostatic drugs. *J Toxicol Environ Health A* 77, 879-87

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

Lee TK, O'Brien K, Eaves GS, Christie KI, Varga L. (1999): Effect of blood storage on radiation-induced micronuclei in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 444 201-206

Lee TK, Allison RR, O'Brien KF, Johnke RM, Christie KI, Naves JL, Kovacs CJ, Arastu H, Karlsson UL (2003): Lymphocyte radiosensitivity correlated with pelvic radiotherapy morbidity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 57(1), 222-9

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

Leitlinie Kolorektales Karzinom, s. S3-Leitlinie 2014

Li F, Lai M (2009): Colorectal cancer, one entity or three. *J Zhejiang Univ Sci B.* 10, 219-229

Li JN, Zhao L, Wu J, Wu B, Yang H, Zhang HH, Qian JJ (2012): Differences in gene expression profiles and carcinogenesis pathways between colon and rectal cancer. *J Dig Dis.* 13, 24-32

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

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

Longley D, Harkin D, Johnston P (2003): 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nature* 3, 330-338

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

Milosevic-Djordjevic O, Stosic I, Vuckovic M, Grujicic D, Marinkovic D. (2011): Baseline and therapy-induced chromosome damages in peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients assessed by the micronucleus assay. *J Buon* 16, 437-43

Minsky BD, Cohen AM, Kemeny N, Enker WE, Kelsen DP, Reichman B, Saltz L, Sigurdson ER, Frankel J (1992): Enhancement of radiation-induced downstaging of rectal cancer by fluorouracil and high-dose leucovorin chemotherapy. *J Clin Oncol* 10, 79-84

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

Moertel CG (1994): Chemotherapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 330, 1136-42

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

Natarajan AT, Palitti F (2008): DNA repair and chromosomal alterations. *Mutat Res* 657, 3-7

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

Nefic H, Handzic I (2013): The effect of age, sex, and lifestyle factors on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of the Bosnian population. *Mutat Res* 753, 1-11

Newcomb PA (1992): Screening sigmoidoscopy and colorectal cancer mortality. *J Natl Cancer Inst* 84(20):p.1572-5

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

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

Norppa H, Falck GC (2003): What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18:221-233.

Parker WB, Cheng YC (1990): Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol Ther.* 48, 381-95

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

Peeters KC, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Kranenbarg EK, Putter H, Wiggers T, Rutten H, Pahlman L, Glimelius B, Leer JW (2007): The TME trial after a median follow-up of 6 years: increased local control but no survival benefit in irradiated patients with resectable rectal cancer. *J Clin Oncol* 25(8), 1014-20

Perez CA, Brady LW: Acute radiation morbidity scoring criteria. In: Perez CA, Brady LW (Hrsg.): Principles and practice of radiation oncology. 2. Auflage. Philadelphia 1993 a, 51-53

Perez CA, Brady LW: Late radiation morbidity scoring criteria. In: Perez CA, Brady LW (Hrsg.): Principles and practice of radiation oncology. 2. Auflage. Philadelphia: 1993 b, 53-55

Peters GJ, Laurensse E, Leyva A, Pinedo HM (1987): Purine nucleosides as cell-specific modulators of 5-fluorouracil metabolism and cytotoxicity. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23, 1869-81

Pignatosa D, Lee R, Hartel C, Sommer S, Nikoghosyan A, Debus J, Ritter S, Durante M (2013): Chromosome inversions in lymphocytes of prostate cancer patients treated with X-rays and carbon ions. *Radiother Oncol.* 109, 256-61

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

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

Pox CP, Altenhofen L., Brenner H, Theilmeier A, Von Stillfried D, Schmiegel W (2012): Efficacy of a nationwide screening colonoscopy program for colorectal cancer. *Gastroenterology* 142(7), 1460-7

Rached E, Schindler R, Beer KT, Vetterli D, Greiner RH (1998): No predictive value of the micronucleus assay for patients with severe acute reaction of normal tissue after radiotherapy. *Eur J Cancer* 34, 378-83

Quack H: 5-Fluorouracil-Spiegelbestimmung unter neoadjuvanter Radiochemotherapie und adjuvanter Chemotherapie beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom, Analyse der pharmakologischen Variabilität von 5-Fluorouracil mittels Nanopartikelimmunoassays. Med. Diss. Göttingen 2015

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

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

Raymond E, Faive S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E (2002): Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer ther* 1, 227-235

Rigaud O, Guedeney G, Duranton I, Leroy A, Doloy MT, Magdelenat H (1990): Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on the circulating lymphocytes of breast cancer patients. I. Chromosome aberrations induced *in vivo*. *Mutat Res* 242, 17-23

Rödel C, Sauer R (2004): Radiotherapy and concurrent radiochemotherapy for rectal cancer. *Surg Oncol.* 13, 93-101

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

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

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

Rödel C, Graeven U, Fietkau R, Hohenberger W, Hothorn T, Arnold D, Hofheinz RD, Ghadimi M, Wolff HA, Lang-Welzenbach M; on behalf of the German Rectal Cancer Study Group (2015): Oxaliplatin added to fluorouracil-based preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy of locally advanced rectal cancer (the German CAO/ARO/AIO-04 study): final results of the multicenter, open-label, randomized, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 16, 979-89

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

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

S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Version 1.1-August 2014. AWMF-Registriernummer: 021/0070L

Sala-Trepat M, Cole J, Green MH, (1990): Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on the circulating lymphocytes of breast cancer patients. III: Measurement of mutant frequency to 6-thioguanine resistance. *Mutagenesis*; 5, 593-8

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

Sauer R, Fietkau R, Wittekind C, Rödel C, Martus P, Hohenberger W, Tschmelitsch J, Sabitzer H, Karstens JH, Becker H et al. (2003): Adjuvant vs. neoadjuvant radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer: the German trial CAO/ARO/AIO94. *Colorectal Dis* 5:406-15

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

Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, Becker H, Raab H, Villanueva M, Witzigmann H (2012): Preoperative vs. postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J Clin Oncol* 16, 1926-1933

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

Schiffel C, Zieres C, Zankl H (1997): Exhaustive physical exercise increases frequency of micronuclei. *Mutat. Res.* 389, 243-246

Schölmerich J, Schmiegel W (Eds.). (2005). (Leitfaden kolorektales Karzinom – Prophylaxe, Diagnostik, Therapie. Bremen: Uni-Med

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

Schmiegel W, Pox A, Adler G (2004): S3-Leitlinienkonferenz “Kolorektales Karzinom”. *Z Gastroenterol* 2004; 17, 1129-77

Schmiegel W, Pox C, Reinacher-Schick A, Adler G, Arnold D, Fleig W, Fölsch U, Frühmorgen P, Graeven U, Heinemann V (2010): S3 guidelines for colorectal carcinoma: results of an evidence-based consensus conference on Friday 6/7, 2004 and June 8/9, 2007 (for the topics IV, VI and VII). *Z Gastroenterol* 46, 65-136

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

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

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

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

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

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

Vohmann C, Urbschat I, Kieschke J, Rohde M, Böckmann S: Krebs in Niedersachsen 2008; Prull-Druck, Oldenburg 2011

Von der Hude W, Kalweit S, Engelhardt G, McKiernan S, Kasper P, Slacik-Erben R, Miltenburger HG, Honarvar N, Fahrigh R, Gorlitz B (2000). *In vitro* micronucleus assay with

chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with in situ exposure to chemical substances. *Mutat Res* 468, 137-163

Virag P, Perde-Schrepler M, Fischer-Fodor E, Tatomir C, Dorneanu SA, Cernea VI, Irimie A (2012): Superior cytotoxicity and DNA cross-link induction by oxaliplatin versus cisplatin at lower cellular uptake in colorectal cancer cell lines. *Anticancer Drugs*. 23:1032-8.

Wannenmacher M, Wenz F, Debus J: *Strahlentherapie*, 2. überarbeitete Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 2013, S. 61, 62

Werbrouck J, Ost P, Fonteyne V, De Meerleer G, De Neve W, Bogaert E, Beels L, Bacher K, Vral A, Thierens H (2013): Early biomarkers related to secondary primary cancer risk in radiotherapy treated prostate cancer patients: IMRT versus IMAT. *Radiother Oncol*. 107, 377-81

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

Wittekind C, Sobin LH: *TNM. Classification of malignant tumours*, 6. Auflage; Wiley-Liss, New York 2002

Wittekind C, Compton C, Brierley J, Sobin L: *TNM-Supplement - Erläuterungen zur einheitlichen Anwendung (Union for International Cancer Control)*. 4. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim 2013

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

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

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

Wolff HA, Wagner DM, Conradi LC, Hennies S, Ghadimi M, Hess CF, Christiansen H (2012): Irradiation with protons for the individualized treatment of patients with locally

advanced rectal cancer: A planning study with clinical implications. *Radiother Oncol.* 102, 30-37

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

Woynarowski JM, Faivre S, Herzig MC, Arnett B, Chapman WG, Trevino AV, Raymond E, Chaney SG, Vaisman A, Varchenko M (2000): Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. *Mol Pharmacol.* 58, 920-7

Yamada S, Durante M, Ando K, Furusawa Y, Kawata T, Majima H, Tsujii H (2000): Complex-type chromosomal exchanges in blood lymphocytes during radiation therapy correlate with acute toxicity. *Cancer Lett.* 150, 215-21

Danksagung

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

Besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. H. A. Wolff, der mir die Thematik der Arbeit nahegebracht hat und somit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Dr. S. Hennies hat mich vom ersten Tag an begleitet. Danke für konstruktive Kritik und Anregung beim Schreiben.

Frau Dipl. Biol. M. Rave-Fränk bin ich zu großem Dank verpflichtet. Sie stand mir stets mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite und war maßgeblich am erfolgreichen Abschluss der Arbeit beteiligt.

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