

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

**der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

---

**Vergleich von Mikronukleus- und Chromosomenaberrationstechnik  
bei der Dokumentation zytogenetischer Schäden  
in neoadjuvant radio-chemotherapierten Rektumkarzinompatienten**

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

vorgelegt von  
Steffen Hennies  
aus  
Göttingen

Göttingen 2010

**Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel**

**I. Berichtstatter: Prof. Dr. med. H. Christiansen**

**II. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. P. Burfeind**

**III. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. T. Crozier**

**Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2011**

**Inhaltsverzeichnis**

|   | <b>Seite</b> |
|---|--------------|
| 1 Einleitung .....  | 1            |
| 1.1 Rektumkarzinom .....  | 1            |
| 1.1.1 Risikofaktoren, Pathologie und Inzidenz.....                                  | 1            |
| 1.1.2 Standardtherapie .....  | 2            |
| 1.1.3 Laufende Studien zur weiteren Verbesserung der Therapieergebnisse bei RC..... | 6            |
| 1.1.4 Klinische Forschergruppe 179 (KFO 179) .....                                  | 7            |
| 1.2 Wirkprinzipien von Radio- und Chemotherapie .....                               | 8            |
| 1.2.1 Radiotherapie.....  | 8            |
| 1.2.2 Chemotherapie.....  | 9            |
| 1.2.2.1 Fluorouracil (5-FU) .....   | 10           |
| 1.2.2.2 Oxaliplatin .....   | 12           |
| 1.3 Methoden zur Detektion zytogenetischer Schäden .....                            | 13           |
| 1.3.1 Periphere Blutlymphozyten (PBL) .....   | 13           |
| 1.3.2 Chromosomenaberrationen.....  | 13           |
| 1.3.3 Mikronukleustest .....  | 14           |
| 1.4 Ziel der Arbeit .....   | 16           |
| 2 Material und Methoden .....   | 18           |
| 2.1 Material.....   | 18           |
| 2.1.1 Chemikalien, Antikörper und Zellen.....                                       | 18           |
| 2.1.2 Medien und Puffer .....   | 19           |
| 2.1.2.1 Medien .....  | 19           |
| 2.1.2.2 Puffer und Lösungen .....   | 19           |
| 2.1.3 Geräte.....   | 20           |
| 2.1.4 Zubehör.....  | 20           |
| 2.1.5 Software.....   | 22           |
| 2.2 Patienten .....   | 22           |
| 2.3 Methoden .....  | 24           |
| 2.3.1 Allgemeines .....   | 24           |
| 2.3.1.1 Blutentnahmen.....  | 24           |
| 2.3.1.2 Vollblut.....   | 24           |
| 2.3.1.3 Experimentelle Bestrahlungen.....   | 25           |
| 2.3.2 Methodik Chromosomen - Präparate.....   | 25           |

---

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 2.3.2.1 | Lymphozyten - Zellkulturen.....   | 25 |
| 2.3.2.2 | Metaphase – Präparate für die CAA.....  | 26 |
| 2.3.2.3 | Objektträger mit Metaphasenpräparaten und Giemsa-Färbung.....   | 27 |
| 2.3.2.4 | Mikroskopische Auswertung.....  | 28 |
| 2.3.3   | Methodik Mikronukleus - Präparate.....  | 29 |
| 2.3.3.1 | Isolierung der Lymphozyten und Kultivierung.....  | 29 |
| 2.3.3.2 | Cytospin.....   | 31 |
| 2.3.3.3 | Mikronukleuspräparate.....  | 31 |
| 2.3.3.4 | Färbung der Mikronukleuspräparate.....  | 31 |
| 2.3.3.5 | Mikroskopische Auswertung der Mikronukleuspräparate.....  | 32 |
| 2.4     | <i>In-vitro</i> -Experiment zur Wirkung der Chemotherapie.....  | 34 |
| 2.5     | Statistische Methoden.....  | 34 |
| 3       | Ergebnisse.....   | 36 |
| 3.1     | Dosis-Wirkungs-Beziehung.....   | 36 |
| 3.2     | Chromosomale Aberrationen und Mikronuklei.....  | 36 |
| 3.2.1   | Vergleich der Verlässlichkeit.....  | 36 |
| 3.2.2   | Spontanraten.....   | 37 |
| 3.2.3   | Zytogenetische Schäden und Radiosensitivität.....   | 38 |
| 3.2.3.1 | Chromosomenaberrationsanalyse.....  | 38 |
| 3.2.3.2 | Mikronukleustest.....   | 40 |
| 3.2.4   | Vergleich von CAA und ZBT.....  | 42 |
| 3.2.5   | 3-Gy- <i>in-vitro</i> -Bestrahlung.....   | 43 |
| 3.2.6   | NDI.....  | 44 |
| 3.2.7   | Wirkung der Chemotherapie auf den zytogenetischen Schaden im Blut.....  | 45 |
| 3.2.8   | Leukozyten und Lymphozyten.....   | 47 |
| 4       | Diskussion.....   | 48 |
| 4.1     | Äquivalenz von Chromosomenaberrationsanalyse und Mikronukleustest.....  | 48 |
| 4.2     | Einfluss der CTX auf den gemessenen zytogenetischen Schaden.....  | 51 |
| 4.3     | Zytogenetischer Schaden in Therapiearm A und B im Vergleich.....  | 52 |
| 4.4     | Lymphozyten zur Detektion zytogenetischer Schäden.....  | 52 |
| 4.5     | Prädiktion strahlentherapeutischer Effekte auf Tumor- und Normalgewebe durch<br>Messung des zytogenetischen Schadens..... | 53 |
| 4.6     | Ausblick.....   | 57 |
| 5       | Zusammenfassung.....  | 60 |

---

|   |                              |    |
|---|------------------------------|----|
| 6 | Anhang: Tabellen 19-23 ..... | 62 |
| 7 | Literaturverzeichnis .....   | 66 |

## Verzeichnis der Abbildungen im Text

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Chemische Struktur von 5-Fluorouracil .....   | 10 |
| Abbildung 2: Metabolische Bioaktivierung und Wirkungsmechanismus von 5-FU .....  | 11 |
| Abbildung 3: Chemische Struktur von Oxaliplatin .....  | 12 |
| Abbildung 4: Die wichtigsten Platin-DNA-Addukte innerhalb eines DNA-Stranges .....   | 12 |
| Abbildung 5: Nuclear Division Index .....  | 16 |
| Abbildung 6: Schichtung nach Dichtegradienten-Zentrifugation: a) Plasma – b) angereicherte Zellfraktion (Interphase aus Lymphozyten/periphere mononukleäre Zellen (PBMC) – c) Separationsmedium – d) Trennscheibe – e) Separationsmedium – f) Pellet (Erythrozyten und Granulozyten) .....               | 29 |
| Abbildung 7: Von links nach rechts: 1) Binukleärer Lymphozyt (BLZ), 2) BLZ mit einem Mikronukleus, 3) BLZ mit multiplen Mikronuklei, 4) BLZ mit Mikronukleus und Nukleoplasmabrücke (Fenech et al. 2003) .....   | 32 |
| Abbildung 8: Beispiele zur Auswahl von binukleären Zellen (BLZ) in der Zytokinese-Block-Technik: a) ideale BLZ; b) BLZ mit sich berührenden Zellkernen; c) BLZ mit schmaler Nukleoplasmabrücke (NPB) zwischen den Zellkernen; d) BLZ mit breiter NPB zwischen den Zellkernen .....                       | 33 |
| Abbildung 9: Beispiele zur Auswahl von Mikronuklei (MN): a) Binukleäre Zelle (BLZ) mit zwei MN, 1/3 bzw. 1/9 des Durchmessers des Zellkerns; b) MN, die die BLZ berühren, aber nicht überlappen; c) BLZ mit Nukleoplasmabrücke zwischen den Zellkernen; d) BLZ mit sechs MN unterschiedlicher Größe..... | 33 |
| Abbildung 10: Mikronuklei (MN) - ähnliche Strukturen, die nicht als MN gewertet werden sollten: a) Trinukleäre Zelle (Durchmesser >1/3 der Zellkerne); b) dichte Tüpfelung; c) platt gedrücktes Kernmaterial; d) Blasen, die eine Verbindung zum Zellkern haben.....                                     | 34 |
| Abbildung 11: Dosis-Wirkungs-Beziehung .....   | 36 |
| Abbildung 12: Zytogenetischer Schaden in Abhängigkeit von der Dosis (Gy). Die Ausbeuten an azentrischen Fragmenten/Zelle sind als Box-Plots dargestellt. ....  | 39 |
| Abbildung 13: Zytogenetischer Schaden in Abhängigkeit von der Dosis (Gy). Die Ausbeuten an dizentrischen Chromosomen/Zelle sind als Box-Plots dargestellt. ....  | 39 |
| Abbildung 14: Zytogenetischer Schaden in Abhängigkeit von der Dosis (Gy). Die Ausbeuten an Mikronuklei/BLZ sind als Box-Plots dargestellt. ....  | 40 |
| Abbildung 15: Zytogenetischer Schaden in Abhängigkeit von der Dosis (Gy). Die Ausbeuten an NPB/BLZ sind als Box-Plots dargestellt. ....  | 41 |

---

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 16: Zytogenetischer Schaden in Abhängigkeit von der Dosis (Gy). Vergleich von Mikronuklei/binukleäre Zelle mit azentrischen Chromosomen/Zelle und dizentrischen Chromosomen (DC)/Zelle sowie von Nukleoplasmabrücken/binukleäre Zelle mit DC.. | 43 |
| Abbildung 17: Zytogenetischer Schaden in Form von Chromosomenaberrationen pro Zelle und Mikronuklei (MN)/Nukleoplasmabrücken (NPB) pro binukleäre Zelle zwischen Arm-A- und Arm-B-Patienten bei 50,4 Gy.....   | 46 |

## Verzeichnis der Tabellen im Text

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: TNM-Klassifikation, Klassifikation nach Dukes und UICC-Stadien (2002).....  | 2  |
| Tabelle 2: Prospektive randomisierte Studien, die eine adjuvante Therapie für RC untersucht haben; Abkürzungen: GITSG, Gastrointestinal Tumor Study Group; NCCTG, North Central Cancer Treatment Group; NSABP, National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project. .... | 4  |
| Tabelle 3: Prospektive randomisierte Studien, die eine neoadjuvante Therapie für RC untersucht haben. ....   | 5  |
| Tabelle 4: Chemikalien.....  | 18 |
| Tabelle 5: Puffer und Lösungen .....   | 19 |
| Tabelle 6: Geräte .....  | 20 |
| Tabelle 7: Zubehör.....  | 20 |
| Tabelle 8: Software.....   | 22 |
| Tabelle 9: Patientencharakteristika.....   | 23 |
| Tabelle 10: Nicht auswertbare Präparate (mit „x“ markiert).....  | 37 |
| Tabelle 11: Spontanraten für Mikronuklei, azentrische Fragmente und dizentrische Chromosomen. n.d.: nicht definiert. ....  | 38 |
| Tabelle 12: Vergleich von Chromosomenaberrationen (CA) pro Zelle und Mikronuklei (MN)/Nukleoplasmabrücke (NPB) pro binukleäre Zelle zwischen den Dosispaaren.....  | 41 |
| Tabelle 13: Vergleich von Chromosomenaberrationen (CA) pro Zelle und Mikronuklei (MN)/Nukleoplasmabrücken (NPB) pro binukleäre Zelle, separat für die unterschiedlichen Dosen (angepasst nach Bonferroni, Signifikanzlevel: $0.05/3 = 0.0167$ ). ....                    | 42 |
| Tabelle 14: Zunahme des zytogenetischen Schadens durch in-vitro-Bestrahlung.....   | 44 |
| Tabelle 15: NDI im Verlaufe der in-vivo-RCT, sowie nach in-vitro-RT.....   | 44 |
| Tabelle 16: Zytogenetischer Schaden in Form von Mikronuklei (MN) pro binukleäre Zelle (BLZ) (n=4) nach Zugabe von Fluorouracil (5-FU), Oxaliplatin und ohne Chemotherapeutikum in Abhängigkeit von der Wirkungszeit. ....  | 45 |
| Tabelle 17: Vergleich des zytogenetischen Schadens in Form von Chromosomenaberrationen pro Zelle und Mikronuklei (MN)/Nukleoplasmabrücken (NPB) pro binukleäre Zelle zwischen Arm-A- und Arm-B-Patienten bei 50,4 Gy. ....   | 46 |
| Tabelle 18: Leukozyten- und Lymphozytenwerte im Verlauf der Bestrahlung.....   | 47 |



---

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 19: Rohdaten der Auszählungen der Chromosomenaberrationsanalyse. Angabe in AF und DC pro 100 Metaphasen. .... | 62 |
| Tabelle 20: Rohdaten der Auszählungen des Mikronukleustests. Angabe der Lymphozyten bzw. BLZ mit MN/1000BLZ. ....     | 63 |
| Tabelle 21: Rohdaten der Auszählungen des Mikronukleustests. Angabe in BLZ mit MN bzw. NPB/1000BLZ. ....              | 63 |
| Tabelle 22: Rohdaten der Auszählungen des Mikronukleustests. Angabe in TLZ mit MN/1000BLZ. ....                       | 64 |
| Tabelle 23: Rohdaten der Auszählungen des Mikronukleustests. Angabe in TeLZ mit oder ohne MN/1000BLZ. ....            | 65 |

---

**Verzeichnis der Abkürzungen im Text**

|               |  |
|---------------|--|
| AF:           | azentrische Fragmente                          |
| AIO:          | Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie   |
| ARO:          | Arbeitsgemeinschaft Radiologischer Onkologie   |
| Bidest:       | Zweifach destilliertes Wasser                  |
| BLZ:          | binukleäre Lymphozyten                         |
| bzw.:         | beziehungsweise                                |
| Ca:           | Karzinom                                       |
| CAO:          | Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Onkologie |
| Cyt-B:        | Cytochalasin B                                 |
| DC:           | dizentrische Chromosomen                       |
| DMSO:         | Dimethylsulfoxid                               |
| DNA:          | Desoxyribonukleinsäure                         |
| DSB:          | Doppelstrangbrüche                             |
| etc.:         | et cetera                                      |
| FKS:          | Fetales Kälber Serum                           |
| 5-FU:         | Fluorouracil                                   |
| G1:           | Gap 1  |
| G2:           | Gap 2  |
| ggf.:         | gegebenenfalls                                 |
| Gy:           | Gray   |
| h:            | Stunden  |
| HEPES-Puffer: | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure |
| KRK:          | Kolorektales Karzinom                          |
| LZ:           | Lymphozyt                                      |
| MC:           | Mammakarzinom                                  |
| Min.:         | Minuten  |
| mm:           | Millimeter                                     |
| MNT:          | Mikronukleustest                               |
| MU:           | Monitorunits                                   |
| n.d.:         | nicht definiert                                |
| o.a.:         | oben angegeben                                 |

---

|          |                                 |
|----------|---------------------------------|
| OT:      | Objekträger                     |
| PBL:     | periphere Blutlymphozyten       |
| PBMC:    | periphere mononukleäre Zellen   |
| PHA:     | Phytohämagglutinin              |
| RC:      | Rektumkarzinom                  |
| RCT:     | Radiochemotherapie              |
| RPMI:    | Roswell Park Memorial Institute |
| RS:      | Radiosensitivität               |
| RT:      | Raumtemperatur                  |
| sec.:    | Sekunden                        |
| S-Phase: | Synthesephase                   |
| TeLZ:    | Tetranukleäre Lymphozyten       |
| TLZ:     | Trinukleäre Lymphozyten         |
| TME:     | Totale mesorektale Exzision     |
| TNM:     | Tumor-Nodus-Metastase           |
| TP:      | Teilprojekt                     |
| TRG:     | Tumorregression                 |
| u.a.:    | unter anderem                   |
| UMG:     | Universitätsmedizin Göttingen   |
| z.B.:    | zum Beispiel                    |
| ZBT:     | Zytokinese-Block-Technik        |
| ZC:      | Zervixkarzinom                  |

## **1 Einleitung**

### **1.1 Rektumkarzinom**

#### **1.1.1 Risikofaktoren, Pathologie und Inzidenz**

Rektumkarzinome gehören zur Gruppe der kolorektalen Karzinome (KRK). Für die Unterscheidung zwischen Kolon- und Rektumkarzinomen ist die mit dem starren Rektosigmoidoskop gemessene Entfernung des makroskopisch erkennbaren aboralen Tumorrandes von der Anokutanlinie maßgebend (Junginger et Hermanek 2008).

Das Rektum reicht vom rektosigmoidalen bis zum anorektalen Übergang, seine Länge beträgt bis 15 cm ab ano, und es wird unterteilt in unteres (<6 cm), mittleres (6-<12 cm) und oberes Drittel (12-15 cm) (Junginger et Hermanek 2008).

Umweltfaktoren, wie eine erhöhte Menge von tierischem Fett in der Nahrung, begünstigen das Auftreten von KRK. Es besteht eine Assoziation zwischen der Menge an verzehrtem Fleisch und dem Auftreten eines KRK (Roberts-Thomson et al. 1996, Fuchs et al. 1999). Ballaststoffreiche Ernährung führt zur signifikanten Senkung des Risikos, an einem KRK zu erkranken (Ghadirian et al. 1997). Prädisponierende Faktoren sind außerdem Alkohol, Nikotin und Bewegungsarmut (Midgley et Kerr 1999).

Patienten mit KRK in der Familienanamnese haben ein erhöhtes Risiko selbst zu erkranken (Graeven et Schmiegel 2004). Seltener vorkommende Risikofaktoren bei Patienten mit hereditärer Veranlagung sind die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) (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 et Schmiegel 2004). Weitere Risikofaktoren sind chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (Graeven et Schmiegel 2004).

90% der KRK entstehen aus Epitheldysplasien und erscheinen als Adenokarzinome, 5-10% als muzinöse Adenokarzinome, 1% sind Siegelringkarzinome (Graeven et Schmiegel 2004).

Das KRK ist bei Frauen wie bei Männern mit 29.000 Sterbefällen pro Jahr die zweithäufigste Krebstodesursache in Deutschland (RKI 2000). Die Zahl der Neuerkrankungen nimmt seit den siebziger Jahren zu und liegt aktuell bei insgesamt 70.000 pro Jahr, wobei die Sterberaten für beide Geschlechter seit Mitte der 1970er Jahre stetig abnehmen (RKI 2000, Schmiegel et

al. 2008). Es ist bei Frauen nach dem Mammakarzinom (MC) und bei Männern nach dem Bronchialkarzinom (BC) die zweithäufigste Krebserkrankung (Bertz et al. 2006). Männer erkranken im Mittel mit 69 Jahren, Frauen mit 75 Jahren (Bertz et al. 2006). Vor dem 40. Lebensjahr tritt das KKK selten auf. Ab dem 80. Lebensjahr liegt die Inzidenz bei Frauen bei über 470 Erkrankungen/100.000, ab dem 85. Lebensjahr liegt die Inzidenz bei Männern bei über 50 Erkrankungen/100.000 (Bertz et al. 2006).

Die häufigste Lokalisation der KKK stellt mit etwa 30% das Rektum dar. 50.000 Patienten erkranken jährlich in Deutschland neu an dieser Tumorentität (Schmiegel et al. 2008). Die 5-Jahres-Überlebensrate beim Rektumkarzinom (RC) aller Stadien liegt für Männer und Frauen bei 56% (Bertz et al. 2006).

In den industrialisierten Ländern ist das RC die dritthäufigste Tumorerkrankung bezogen auf die Gesamtbevölkerung, bei Nichtrauchern ist es die häufigste (Parkin et al. 2005).

### 1.1.2 Standardtherapie

Die Behandlung der KKK richtet sich nach Ausbreitung und Lokalisation des Karzinoms. Zur Ermittlung des Stadiums wird die TNM (Tumor-Nodus-Metastase)-Klassifikation verwendet (Hermanek et al. 1999). Die Klassifikation nach Dukes wurde in den letzten Jahren durch die differenziertere Einteilung der UICC (Union International contre le Cancer) abgelöst, die auf dem TNM-System beruht. Es werden Primärtumor (T), Lymphknotenmetastasen (N), und Fernmetastasen (M) beurteilt (Tabelle 1).

*Tabelle 1: TNM-Klassifikation, Klassifikation nach Dukes und UICC-Stadien (2002)*

| TNM-Klassifikation |                                   | Klassifikation nach Dukes | UICC-Stadium |
|--------------------|-----------------------------------|---------------------------|--------------|
| Tis                | Carcinoma in situ                 | -                         | -            |
| T1                 | Muscularis propria nicht befallen | A                         | I            |
| T2                 | Muscularis propria befallen       |                           |              |
| N0                 |                                   |                           |              |
| T3                 | Subserosa befallen                | B                         | II           |
| T4                 | Befall angrenzender Organe oder   |                           |              |
| N0                 | Penetration des viszeralen        |                           |              |

|                          |  |   |     |
|--------------------------|--|---|-----|
|                          | Peritoneums  |   |     |
| N1<br>N2<br>jedes T      | 1-3 regionäre Lymphknoten befallen<br>> 3 regionäre Lymphknoten befallen | C | III |
| M1<br>jedes T<br>jedes N | Fernmetastasen   | D | IV  |

Trotz identischer Risikofaktoren und Pathologie werden Rektum- und Kolonkarzinome im kurativen Ansatz unterschiedlich therapiert. Kolonkarzinome werden in frühen Stadien (UICC-Stadium I-II) primär operiert, in lokal fortgeschrittenen Stadien (UICC-Stadium III) folgt nach der Operation eine adjuvante Chemotherapie (Moertel et al. 1990). Da sich diese Arbeit mit dem RC beschäftigt, folgt detailliert die Entwicklung der Therapie beim RC:

Vorrangige Bedeutung in der kurativen Therapie des RC hat die chirurgische Tumorresektion. Es wird nach Möglichkeit eine R0-Resektion, also eine vollständige Entfernung des Tumors durchgeführt. Richtlinien der Onkologischen Chirurgie am Rektum sind dabei Radikalität nach proximal (komplette Resektion des Lymphabflussgebietes entlang der Arterien), nach lateral (Resektion des Mesorektums, totale mesorektale Exzision, TME) und die Tumorentfernung en bloc (Pinsk and Phang 2007). RC des UICC-Stadiums I haben nach konventioneller chirurgischer Therapie gute Heilungschancen, sodass keine zusätzliche Therapie indiziert ist. Abhängig vom Tumorstadium, dem wichtigsten Prognosefaktor (Stocchi et al. 2001), neigen vor allem lokal fortgeschrittene RC (UICC-Stadien II/III) trotz optimaler chirurgischer Therapie zu Lokalrezidiven und Fernmetastasen (Schaefer et al. 2007). Die Häufigkeit lokoregionärer Rezidive wird von der Ausdehnung, der Lokalisation und der Biologie des Enddarmtumors, von der chirurgischen Operationstechnik, insbesondere der kunstgerechten Mesorektumexzision, sowie von der Durchführung und der Qualität adjuvanter Maßnahmen bestimmt. Ein wesentlicher Schritt in der Verbesserung der Prognose war die Einführung der TME, durch welche die Lokalrezidivrate der RC in den UICC-Stadien II und III wesentlich gesenkt werden konnte (Enker et al. 1995). Seit den 60er Jahren werden neben der Optimierung der chirurgischen Maßnahmen verschiedene Strategien und Schemata bezüglich einer zusätzlichen Behandlung verfolgt, um die Behandlungsergebnisse im Vergleich zur alleinigen Operation weiter zu verbessern.

Studien mit adjuvanter Radiochemotherapie (RCT) zeigten dabei eine Verringerung der Lokalrezidivrate ohne Effekt auf das Gesamtüberleben im Vergleich mit alleiniger Operation oder Operation plus Radiotherapie (GITSG 1985, Krook et al. 1991). Basierend auf den Ergebnissen der unten gezeigten Studien (Tabelle 2) wurde 1990 durch die „National Institutes of Health Consensus Conference“ (NIH 1990) und 1994 im Konsensus der Chirurgischen Arbeitsgemeinschaft für Onkologie (CAO), Arbeitsgemeinschaft Radiologischer Onkologie (ARO) und Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO) (Mitteilungen der Deutschen Krebsgesellschaft, 1994) die kombinierte postoperative Radio- (45-55 Gray (Gy)) und 5-FU-basierte Chemotherapie als Standardtherapie für RC in den UICC-Stadien II und III empfohlen.

*Tabelle 2: Prospektive randomisierte Studien, die eine adjuvante Therapie für RC untersucht haben; Abkürzungen: GITSG, Gastrointestinal Tumor Study Group; NCCTG, North Central Cancer Treatment Group; NSABP, National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project.*

| Studie                         | Jahr | N   | Resultat   |
|--------------------------------|------|-----|--|
| GITSG<br>(GITSG 1985)          | 1985 | 202 | Postoperative Radiochemotherapie verbessert die loko-regionäre Kontrolle, kein Effekt auf Gesamtüberleben  |
| NSABP<br>(Fisher et al. 1988)  | 1988 | 555 | Postoperative Bestrahlung reduziert Lokalrezidiv, keine Verbesserung des Gesamtüberlebens  |
| NCCTG<br>(Krook et al. 1991)   | 1991 | 204 | Postoperative Radiochemotherapie verringert Lokalrezidivrate verglichen mit alleiniger postoperativer Radiotherapie                                  |
| NSABP<br>(Wolmark et al. 2000) | 2000 | 694 | Ergänzung postoperativer Strahlentherapie zu postoperativer Chemotherapie reduziert Lokalrezidivrate, keine Änderung der Inzidenz zur Metastasierung |

Bereits seit den 70er Jahren sind präoperative Radiotherapien bei der Behandlung operabler Rektumkarzinome besprochen worden (Higgins et al. 1975). Dies wurde immer wieder bezüglich des therapeutischen Nutzens geprüft und zeigte meist eine Reduzierung der Lokalrezidivrate gegenüber alleiniger chirurgischer Intervention (Cedermark et al. 1995, CCCG 2001) (Tabelle 3). Im „Swedish rectal cancer Trial“ (SRCT 1997) erhielten die Patienten eine präoperative Kurzzeitbestrahlung (5x5 Gy in einer Woche) ohne Chemotherapie oder eine alleinige Operation. In dieser Studie als auch in einer Metaanalyse (Camma et al. 2000) konnte bei präoperativer Radiotherapie im Vergleich zur alleinigen Operation zusätzlich zur Verringerung der Lokalrezidivrate ein Überlebensvorteil festgestellt werden. Der Überlebensvorteil ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass hier standardmäßig keine TME durchgeführt wurde. Die Mehrzahl anderer randomisierter Studien und eine Metaanalyse konnten den Überlebensvorteil nicht oder nur für Subgruppen zeigen (CCCG 2001). Die holländische Studiengruppe standardisierte die Operationsmethode (TME) und verglich Patienten mit präoperativer Kurzzeitbestrahlung (5x5 Gy in einer Woche) mit Patienten, die nur operiert wurden (Kapiteijn et al. 2001). Die Lokalrezidivrate konnte durch die präoperative Radiotherapie verringert werden, es gab hier jedoch keinen Effekt auf das Gesamtüberleben.

Die Daten zur präoperativen Radiotherapie und zur 5-FU-basierten adjuvanten Chemotherapie führten zu der Idee, im Rahmen multimodaler Therapiekonzepte beim Rektumkarzinom neoadjuvante mit adjuvanten Radiochemotherapien zu vergleichen.

*Tabelle 3: Prospektive randomisierte Studien, die eine neoadjuvante Therapie für RC untersucht haben.*

| Studie  | Jahr | N    | Resultat  |
|---|------|------|---|
| Swedish rectal cancer trial (SRCT 1997)               | 1997 | 908  | Präoperative Hochdosis-Radiotherapie (5x5 Gy in einer Woche) reduziert Lokalrezidive, verbessert Gesamtüberleben              |
| Dutch Colorectal Cancer Group (Kapiteijn et al. 2001) | 2001 | 1805 | Präoperative Bestrahlung reduziert Lokalrezidive, kein Effekt auf Gesamtüberleben, standardisiertes Operationsverfahren (TME) |



|   |        |      |     |   |
|---|--------|------|-----|---|
| German<br>Cancer Study Group<br>(RCSG) (Sauer et al.<br>2004) | Rectal | 2004 | 823 | Präoperative Radiochemotherapie<br>reduziert Lokalrezidive und<br>vermindert Nebenwirkungen im<br>Vergleich zu postoperativer<br>Radiochemotherapie, kein Effekt<br>auf Gesamtüberleben |
|---|--------|------|-----|---|

Eine große deutsche, multizentrische randomisierte Phase-III-Studie zur adjuvanten und neoadjuvanten Radiochemotherapie (CAO/ARO/AIO-94-Studie) testete zwischen 1994 und 2002 zwei Therapiearme. Patienten im Prüfarm erhielten eine neoadjuvante Radiochemotherapie (50,4 Gy, begleitend 5-FU in der 1. und 5. Therapiewoche), Patienten im Kontrollarm erhielten eine adjuvante Radiochemotherapie (50,4 Gy plus 5,4 Gy Tumorboost, begleitend 5-FU in der 1. und 5. Therapiewoche). Es zeigte sich eine signifikante Reduzierung der Lokalrezidivrate im präoperativen Arm (6% im Vergleich zu 13% im postoperativen Arm). Das Auftreten höhergradiger akuter und chronischer Toxizität der multimodalen Therapie war im Vergleich im präoperativen Arm signifikant niedriger als im postoperativen Arm. Die Rate sphinktererhaltender Operationsverfahren durch Vorbehandlung im Vergleich zur sofortigen Operation konnte von 19% auf 39% verdoppelt werden (Sauer et al. 2004). Somit wurde eine Überlegenheit der präoperativen RCT im Gegensatz zur postoperativen RCT in dieser Studie beschrieben, jedoch konnte das Gesamtüberleben nicht verbessert werden (5-Jahres-Überlebensrate 74% bei prä- und postoperativer RCT). Bestätigt wurden die Daten der deutschen Studie kürzlich durch die französische FFCD (Fédération Francophone de Cancérologie Digestive) 9203-Studie (Gérard et al. 2006). Die neoadjuvante RCT (Radiotherapie plus 5-FU-basierte Chemotherapie) ist auf der Grundlage dieser Studienergebnisse laut der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVC) - Konsensuskonferenz 2004 in Bochum - die neue Standardtherapie bei der Behandlung des lokal fortgeschrittenen RC (Bölke et al. 2005, Roh et al. 2009).

### 1.1.3 Laufende Studien zur weiteren Verbesserung der Therapieergebnisse bei RC

Nachdem randomisierte Studien gezeigt hatten, dass eine neoadjuvante Radiochemotherapie zwar die Lokalrezidivrate verbessern kann, nicht jedoch das Gesamtüberleben (siehe oben),

werden im Rahmen der noch nicht veröffentlichten Nachfolgestudie der „German Rectal Cancer Study Group“ (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“) zwei Therapiearme mit unterschiedlichen Chemotherapieschemata bei der multimodalen Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms (UICC-Stadien II/III) geprüft. Neben dem Standardarm, in dem parallel zur Radiatio sowie in der Adjuvanz nach OP 5-FU gegeben wird, erhalten die Patienten im experimentellen Arm eine intensiviertere Chemotherapie mit 5-FU und Oxaliplatin. Es soll mit dieser Studie unter anderem die Frage beantwortet werden, ob durch eine intensiviertere Chemotherapie die Fernmetastasierungsrate im Verlauf gesenkt werden kann und ob daraus gegebenenfalls eine Verbesserung der Gesamtüberlebensraten zu erzielen ist. Nachdem Erfahrungen anderer Studien gezeigt hatten, dass die neoadjuvante Radiatio bei Tumoren des oberen Rektumdrittels hinsichtlich ihres Effektes kritisch zu hinterfragen ist (Kapiteijn et al. 2001), werden in die laufende CAO/ARO/AIO-04-Studie nur Patienten mit Tumoren des unteren und mittleren Rektumdrittels eingeschlossen.

Lokal fortgeschrittene Tumore des oberen Rektumdrittels werden an der Universitätsmedizin Göttingen in die German-Advanced-Surgical-Study-Group (Gast)-05-Studie („Prospektiv randomisierte, multizentrische Phase-II-Studie: Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms (UICC-Stadium II und III) im oberen Rektumdrittel (12-16 cm ab Anokutanlinie)) eingeschlossen. Diese prüft eine qualitätsgesicherte totale (TME) im Vergleich mit einer partiellen mesorektalen Exzision (PME) gefolgt von einer adjuvanten Chemotherapie (5-FU + Folinsäure + Oxaliplatin).

#### **1.1.4 Klinische Forschergruppe 179 (KFO 179)**

Bei der multimodalen kurativen Therapie lokal fortgeschrittener Rektumkarzinome ist das Ansprechen der Tumore auf die neoadjuvante Therapie individuell unterschiedlich. Während es bei einigen Patienten zu einer kompletten histopathologischen Remission kommt, sprechen andere Tumore so gut wie gar nicht auf die Vorbehandlung an (Wolff HA et al. 2010). Unterschiedlich ist auch die Strahlenempfindlichkeit des Normalgewebes: Einige Patienten zeigen starke Akutreaktionen unter der Radiochemotherapie, andere hingegen weniger intensive. In der interdisziplinären KFO 179 (Biological Basis of Individual Tumor Response

in Patients with Rectal Cancer) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) an der Universitätsmedizin Göttingen werden die molekularbiologischen Hintergründe individueller Therapie-Erfolge und die mit der Therapie verbundenen Nebenwirkungen für den einzelnen Patienten erforscht. Ziel ist eine individualisierte Tumorthherapie des Rektumkarzinoms: Die in der Studie erworbenen Erkenntnisse sollen in der Zukunft dazu dienen, eine Vorhersage darüber zu treffen, welcher Patient von welcher Therapie profitiert beziehungsweise mit welchen Nebenwirkungen zu rechnen ist. Die Etablierung eines Response- (Wirkung) und Toxizitäts-Scores (Nebenwirkungen) soll dann eine auf den Patienten zugeschnittene Therapie ermöglichen (personalisierte Medizin). Diese Erkenntnisse sollen dann zu einer auf den einzelnen Menschen abgestimmten Therapie führen, um den Therapieerfolg und die Lebensqualität für Menschen mit Rektumkarzinom zu erhöhen.

Die KFO 179 besteht aus 8 Teilprojekten (TP) unterschiedlicher Disziplinen, innerhalb derer sich die Strahlentherapie (TP 6a) und die Klinische Pharmakologie (TP 6b) das Teilprojekt 6 teilen. Aufgabe ist Erhebung und Dokumentation klinischer, pharmakologischer und biologischer Parameter, die in die Analyse bekannter und zu identifizierender molekularer Targets als prädiktive Faktoren für das Ansprechen auf eine multimodale Radiochemotherapie eingehen sollen.

## **1.2 Wirkprinzipien von Radio- und Chemotherapie**

### **1.2.1 Radiotherapie**

Das wesentliche intrazelluläre Ziel der Strahlung ist die DNA, an der ionisierende Strahlen Einzel- und Doppelstrangbrüche (DSB), Basenschäden und abnorme Verbindungen von Molekülen auslösen können (Herrmann und Baumann 1997). Die genetische Integrität wird von enzymatischen Reparatursystemen aufrechterhalten, die die weit überwiegende Mehrzahl aller DNA-Schäden schnell und sehr effektiv reparieren. Dennoch auftretende nicht bzw. falsch reparierte DNA-Schäden werden heute als wichtigster Mechanismus für die biologische Wirkung einer Bestrahlung angesehen.

Die Zahl der DNA-Schäden durch Bestrahlung ist weit höher als die Zahl der Ereignisse, die zu Mutationen oder Zelltod führen. Durch Bestrahlung entstehen pro Gy ca. 4000 - 5000 DNA-Schäden pro Zelle, hauptsächlich Basenschäden und Einzelstrangbrüche, und ca. 40 Doppelstrangbrüche. Die Erkennung der DNA-Schäden erfolgt durch Reparaturenzyme, die

direkt in die Zellzyklus-Kontrolle eingreifen können (Murray und Hunt 1993, Natarajan und Palitti 2008). Der Zellteilungszyklus beinhaltet G1- und G2-checkpoints zur Überwachung der Integrität der DNA. Bei Schadenserkennung kann der Zellzyklus an diesen Stellen angehalten werden, bis die Reparatur abgeschlossen ist (G1- bzw. G2-Block). Während der Mitose und in der G2-Phase sind Zellen am strahlensensibelsten, in der S-Phase am resistantesten. Wird ein irreparabler Schaden gesetzt, so besteht die Möglichkeit, dass eine Apoptose (über p53) oder ein „reproduktiver Zelltod“ (Verlust der unbegrenzten Teilungsfähigkeit) eintritt. Hierbei führen Chromosomenschäden sofort oder verspätet dazu, dass die Tochterzellen Mitosen nicht zu Ende führen können (Mitose-assoziiertes Zelltod). Dieser Zelltod spielt eine zentrale Bedeutung für die Antitumorwirkung einer Strahlentherapie und die Entstehung von Normalgewebsschäden. Wesentliche Einflussfaktoren auf das Zellüberleben nach Bestrahlung sind die genetisch bedingte (intrinsische) Strahlenempfindlichkeit, die Zellzyklusphase, die Fraktionierung der Strahlendosis sowie die Anwesenheit von Sauerstoff (Tubiana 1990).

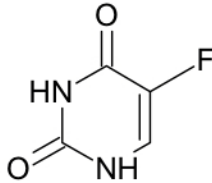
### **1.2.2 Chemotherapie**

Tumore zeichnen sich durch autonome Zellvermehrung und überschießendes Wachstum aus. Bösartige Tumore kennzeichnet ein infiltrierendes Wachstum und Metastasierung entweder lymphogen oder hämatogen in den gesamten Organismus. Systemisch wirksame Arzneimittel ermöglichen eine Tumorthherapie vor allem bei der Behandlung von disseminierten Tumoren und Metastasierungen. Zytostatika greifen schnell teilendes Zellgewebe an und hemmen das Zellwachstum bzw. wirken zytotoxisch. Man teilt Chemotherapeutika nach ihren Wirkungsmechanismen ein in Alkylanzien, Antimetabolite, Mitosehemmstoffe, sowie Topoisomerase-Hemmstoffe (Mutschler et al. 2001). Da die einzelnen Arzneien in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus wirken, kombiniert man verschiedene Präparate miteinander, um eine größtmögliche Effektivität zu erzielen (Polychemotherapie). Für jeden Patienten wird ein individuelles Therapieschema bezüglich der Substanzen und der Dosierung (je nach Art der Erkrankung, Körperoberfläche etc.) erstellt.

Zytostatika greifen auch gesundes, schnell proliferierendes Gewebe an, wie z.B. Epithelien der Schleimhäute und Gonaden, sowie Haut und Hautanhangsgebilde und das blutbildende System. Es kann zu gastrointestinalen Störungen, Schädigung der Reproduktionsorgane, reversiblen Haarausfall oder Schwächung der Infektabwehr kommen.

Bei multimodalen Therapiekonzepten werden Chemotherapeutika wie 5-FU und Oxaliplatin zusätzlich als „Radiosensitizer“ eingesetzt, um den Tumor empfindlicher für die Bestrahlung zu machen.

### 1.2.2.1 Fluorouracil (5-FU)



5-Fluorouracil

Abbildung 1: Chemische Struktur von 5-Fluorouracil

Das Zytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU) entstammt der Gruppe der Pyrimidin-Antimetaboliten und wird seit den 50iger Jahren in der Therapie kolorektaler Karzinome als Chemotherapeutikum der Wahl eingesetzt (Abbildung 1). Zur Wirkungsentfaltung muss 5-FU innerhalb der Zellen zunächst in seine entsprechenden Nukleotide überführt werden (Pizzorno et al. 1997).

Ausgehend von Fluorouridinmonophosphat (FUMP) können die Wirkungen von 5-FU auf drei Wege der Bioaktivierung zurückgeführt werden (Abbildung 2):

- 1) Durch Phosphorylierung wird Fluorouridinmonophosphat (FUMP) über Fluorouridindiphosphat (FUDP) in Fluorouridintriphosphat (FUTP) mittels Nukleotidkinase überführt. Als ebenso gutes Substrat der RNA-Polymerase konkurriert Fluorouridintriphosphat (FUTP) mit dem normalen Substrat Uridintriphosphat (UTP) konzentrationsabhängig um den Einbau in die RNA (Pizzorno et al. 1997). Durch den Einbau kommt es zu einer Störung der RNA-Funktion bis hin zum Zelltod. Der Einbau in die nukleare RNA hemmt die Umwandlung in ribosomale RNA (Wilkinson et al. 1975).
- 2) Bei der Reduktion von Fluorouridinmonophosphat (FUMP) mittels Ribonukleotidreduktase entsteht Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP), das in Konkurrenz mit dem natürlichen Substrat Desoxyuridinmonophosphat (dUMP)

das Enzym Thymidilatsynthetase hemmt (Abbildung 2). Die Thymidilatsynthetase ist für die Synthese von Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) als Vorläufer der DNA notwendig. Ihre Hemmung erfolgt durch Bildung eines ternären Komplexes mit dem Hemmstoff Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) und Methylentetrahydrofolat als Cofaktor (Lipp 1999).

- 3) Nach Phosphorylierung von Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) zu Fluorodesoxyuridintriphosphat (FdUTP) wird dieses durch die DNA-Polymerase in die DNA eingebaut und beeinträchtigt so deren Stabilität (Abbildung 2). Da Fluorodesoxyuridintriphosphat (FdUTP) im Rahmen eines DNA-Repair-Mechanismus der Zelle wieder entfernt werden kann, trägt dieser Effekt nur einen kleinen Teil zur Wirkung von 5-FU bei.

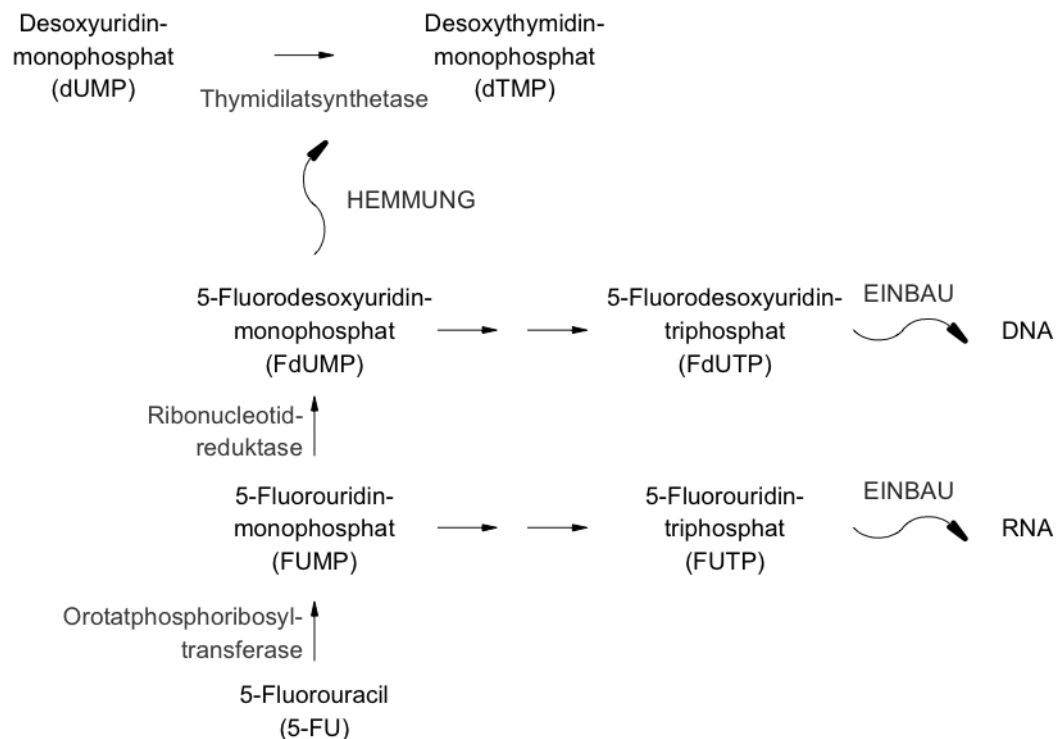


Abbildung 2: Metabolische Bioaktivierung und Wirkungsmechanismus von 5-FU

### 1.2.2.2 Oxaliplatin

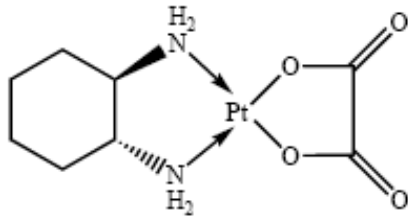


Abbildung 3: Chemische Struktur von Oxaliplatin

Oxaliplatin ist eine antineoplastische Substanz und gehört zu einer neuen Klasse von Platinderivaten, bei denen das Platinatom mit 1,2-Diaminocyclohexan (DACH) und einer Oxalatgruppe komplexiert ist (Abbildung 3). Ebenso wie bei anderen Platinverbindungen beruht die Wirkung von Oxaliplatin auf der Bildung von Platin-DNA-Addukten (Abbildung 4). Dadurch kommt es zur Hemmung der DNA-Synthese und letztlich zum Untergang der Zelle. Aus Studien zum Wirkmechanismus geht hervor, dass Aquakomplexe, die im Rahmen der Biotransformation von Oxaliplatin entstehen, mit der DNA interagieren und Intra- und Inter-Strang-Quervernetzungen bilden. Der eigentliche zytotoxische Schaden beruht wahrscheinlich auf Platin-DNA-Addukten innerhalb eines DNA-Stranges, die entweder zwischen zwei benachbarten oder dicht beieinander liegenden Guaninen oder einem benachbarten Guanin-Adenin-Basenpaar entstehen, da diese Addukte die häufigsten und außerdem dazu fähig sind, sowohl die DNA-Replikation als auch die Transkription zu blockieren (NGTATG 1992, Saris et al. 1996, Raymond et al. 1998) (Abbildung 4). Über die Addukte innerhalb des Stranges hinaus kann Oxaliplatin (ebenso wie andere Platinverbindungen) Verbindungen zwischen DNA-Strängen sowie zwischen DNA und Proteinen induzieren.

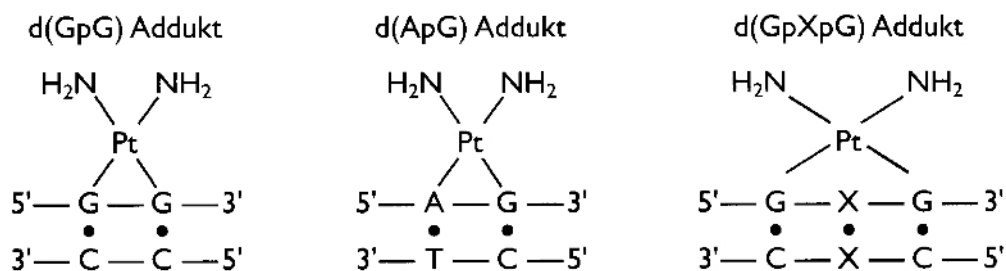


Abbildung 4: Die wichtigsten Platin-DNA-Addukte innerhalb eines DNA-Stranges

### 1.3 Methoden zur Detektion zytogenetischer Schäden

#### 1.3.1 Periphere Blutlymphozyten (PBL)

Lymphozyten befinden sich innerhalb des Zellzyklus überwiegend in der G<sub>0</sub>-Phase, die als Ruhephase bezeichnet wird. Die Teilungsfähigkeit dieser Zellen im Körper bedarf einer Stimulation durch spezifische Antigene. *In vitro* müssen dem Zellkulturmedium spezielle Mitogene (z.B. Phytohämagglutinin (PHA)) zur Stimulation der Lymphozyten hinzugegeben werden. PHA ist ein Protein aus der Bohnenpflanze *Phaseolus vulgaris* und stimuliert überwiegend T-Lymphozyten (Beninson et al. 1986). B-Lymphozyten werden durch die aktivierten T-Lymphozyten nach einigen Tagen stimuliert (Han and Dadey 1978). Bei der Untersuchung von Chromosomenschäden in mitotischen Zellen bis 96h nach Kultivierung werden daher größtenteils T-Lymphozyten analysiert.

PBL sind ein geeigneter Parameter zur Bestimmung des zytogenetischen Effektes nach RT: 1) Sie sind die radiosensitivsten Zellen des menschlichen Blutes, deren dosisabhängige Abnahme im Blutbild höher ist als bei anderen Blutzellen (Dutreix et al. 1987), 2) Gleichverteilung im Körper und kontinuierliche Durchmischung, 3) ruhende Zellen, die den induzierten Schaden speichern und ihn nach mitogenetischer Stimulation durch PHA wiedergeben, 4) geringe *in-vitro*-Dosen führen zu einem messbaren zytogenetischen Effekt mit vernachlässigbarem Zelltod (Catena et al. 1996). Durch die fraktionierte RT überleben genügend PBL, um einen zytogenetischen Effekt messbar zu machen.

#### 1.3.2 Chromosomenaberrationen

Seit den 1940er Jahren werden Chromosomenschäden als Ursache für den strahlenbedingten Zelltod angesehen. Zur Bildung von Chromosomenaberrationen kommt es durch zytogenetische Schädigungen, die exogen induziert sein können oder durch spontane Mutationen hervorgerufen werden. Die spontan entstandenen Chromosomenaberrationen werden als Spontanrate bezeichnet und können bei unbehandelten Patienten vor Beginn der Therapie als Ausgangswert erfasst werden. Die Spontanrate ist ein Maß für die Empfindlichkeit und genetische Stabilität und kann u.a. durch die Chromosomenaberrationsanalyse (CAA) bestimmt werden.



Man unterscheidet numerische von strukturellen Chromosomenaberrationen, also eine zahlenmäßige Abweichung von strukturellen Besonderheiten der Chromosomen. Zu strukturellen Chromosomenaberrationen, die aus falsch- oder nichtreparierten DNA-Doppelstrangbrüchen entstehen, gehören die reziproke Translokation, die Deletion, die Inversion und die dizentrischen Chromosomen (DC) (Obe et al. 1992). In dieser Arbeit werden zwei Formen der Chromosomenaberration untersucht. Die azentrischen Fragmente (AF), die aus einem Verlust von einem Teil eines Chromosoms meist infolge unreparierter Doppelstrangbrüche entstehen (Deletion), und die DC, die aus fehlreparierten Doppelstrangbrüchen entstehen (Dikomey 2003). Für die Analyse der schädigenden Wirkung von Strahlen werden die Zellen in der Metaphase durch Colcemid arretiert, Chromosomenpräparate werden hergestellt und die induzierten Chromosomenaberrationen (AF und DC) unter dem Lichtmikroskop untersucht und ausgezählt.

### **1.3.3 Mikronukleustest**

Der in dieser Arbeit verwendete Mikronukleustest (MNT) ist ein Zelltest, der ebenfalls die Möglichkeit bietet, chromosomale Schädigungen nachzuweisen. Ein Mikronukleus (MN) ist eine intrazelluläre Struktur, die Chromatin enthält und eine eigenständige Zellmembran besitzt. Die Größe entspricht 1/16 bis 1/3 der Größe des Nukleus. Mikronuklei können ganze Chromosomen oder einzelne Fragmente enthalten, die bei der Zellteilung nicht in eine der beiden Tochterzellen integriert wurden. Bei der Bildung von Mikronuklei treten Zellen mit Chromosomenaberrationen während der Mitose in die Anaphase ein, in der die Bruchstücke nicht richtig verteilt werden. In der darauf folgenden Interphase kondensieren die zurückgebliebenen Chromosomenstrukturen zu einem oder mehreren Mikronuklei, die sich durch Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Farbstoffe anfärben und unter einem Lichtmikroskop nachweisen lassen. Durch Hinzufügen von Cytochalasin-B (Cyt-B) wird die Zytokinese inhibiert, während die Karyokinese immer noch möglich ist. Es entstehen zweikernige Zellen mit im Zytoplasma enthaltenen Mikronuklei.

Die Mikronukleusmethode wurde 1959 erstmals für den Nachweis mutagener Wirkungen eingesetzt (Evans et al. 1959). Der MNT wurde in den 70er Jahren beschrieben, als die Korrelation zwischen genotoxischem Potential von Agenzien und Induktion von Mikronuklei festgestellt wurde (Schmid 1975, Fritzenschaf et al. 1993). Schmid (1975) und Heddle (1973) beschrieben unabhängig voneinander die Auszählung der Mikronuklei, in der Hämatologie

bekannt als Howell-Jolly Körperchen, als Alternative zur Detektion chromosomaler Schäden (Heddle 1973, Schmid 1975).

Der MNT ist im Laufe der Jahre mit variablen Versuchsparametern durchgeführt und für unterschiedliche Zellarten benutzt worden. Häufig werden Lymphozyten aufgrund ihrer schnellen Kultivierbarkeit und Empfindlichkeit verwendet (Fenech and Morley 1985, Keulers et al. 1998, Venkatachalam et al. 1999, Tsai et al. 2001). Die Mikronukleusentstehung in Abhängigkeit vom Alter der Probanden und in nachfolgenden Versuchen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis bei Röntgenstrahlen wurde an Hand humaner Lymphozyten untersucht (Fenech and Morley 1986). Dabei wurde eine Zunahme von Mikronuklei in Abhängigkeit von beiden Parametern beobachtet. Fenech erforschte des Weiteren die Mikronukleusentstehung in Abhängigkeit von z.B. verschiedenen Blutplasmawerten (Fenech and Rinaldi 1994, Fenech 1998) oder vegetarischer Ernährung (Fenech and Rinaldi 1995) und wendete den MNT zur Bestimmung chromosomaler Schäden an (Umegaki and Fenech 2000).

Fenech und Morley konnten den MNT weiterentwickeln, indem Sie die Zytokinese-Block-Technik (ZBT) einführten (Fenech and Morley 1985, Fenech and Morley 1986). Die hierbei entstehenden binukleären Lymphozyten (BLZ) haben nur eine Zellkernteilung hinter sich. Durch das Zählen der MN in nur diesen Zellen erhält man zuverlässige Vergleiche chromosomaler Schäden in Zellpopulationen, die sich z.B. in ihrer Zellteilungskinetik unterscheiden (Fenech 2000). Die Sensitivität des MNT wurde somit durch die ZBT erhöht.

Die ZBT beruht auf einer Modulation der Zellteilung. Nach einer genotoxischen Behandlung, *in vitro* oder *in vivo*, werden die PHA-stimulierten Lymphozyten kultiviert und nach 44 Stunden (h) wird Cyt-B hinzugefügt (Fenech 1993). Cyt-B ist ein Pilzgift, das die Mikrofilamente inhibiert und damit die Zytoplasmateilung während der Mitose hemmt. Somit entstehen nach abgelaufener Karyokinese Zellen mit zwei Zellkernen, so genannte binukleäre Zellen. Auf diese Weise können alle Zellen, die postexpositionell eine Mitose vollenden, sichtbar gemacht und die Mikronuklei ausgezählt werden. Diese Entwicklung erlaubt direkte und zuverlässige Vergleiche mit Chromosomenaberrationsuntersuchungen (Fenech 1993). Littlefield und Ramalho zeigten, dass durch die ZBT 60-90% der AF erfasst werden (Ramalho et al. 1988, Littlefield et al. 1989). DC werden im MNT als Nukleoplasmabrücken (NPB) dargestellt. NPB entstehen vermutlich, wenn Zentromere von DC oder Chromatiden in der Anaphase zu gegenüberliegenden Zellpolen gezogen werden (Umegaki and Fenech 2000, Crott et al. 2001). Die genaue Herkunft ist jedoch noch unklar (Fenech 2007). Thomas et al.

beschrieben eine enge Korrelation zwischen DC, Ringchromosomen und NPB (Thomas et al. 2003).

Die ZBT ermöglicht auch eine Auswertung der mitotischen Aktivität einer Zellkultur und erlaubt die Berechnung des Nuclear Division Index (NDI), der sich durch den Anteil der durch Mitose entstandenen BLZ an der Gesamtzellzahl ermitteln lässt (Abbildung 5).

$$\text{NDI} = \frac{M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)}{N}$$

Abbildung 5: Nuclear Division Index

*M 1-4: Anzahl der Zellen mit 1-4 Zellkernen*

*N: Anzahl der insgesamt ausgewerteten Zellen*

Sein Wert liegt meist im Bereich von  $1 \leq \text{NDI} \leq 2$ , unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Inkubationszeit von Cyt-B ungefähr der Populationsverdopplungszeit entspricht. Durch die Bestimmung des NDI ist es möglich, die Vitalität einer Zellkultur unter genotoxischer Behandlung zu erfassen und sicherzustellen (Fenech 2000).

Der MNT hat sich seit 1959 (Evans et al. 1959) zu einem „Cytome“ – Test entwickelt, durch den Zellproliferation, Zelltod und chromosomale Veränderungen beurteilt werden können (Umegaki und Fenech 2000, Fenech 2007). Heute gehört er im Rahmen der Mutagenitätsforschung zu den am häufigsten eingesetzten Nachweismethoden und ist essentieller Bestandteil der genetischen Toxikologie.

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Das übergeordnete Ziel des Projektes ist die Identifizierung zuverlässiger Prädiktoren für die individuelle Empfindlichkeit gegenüber einer Radiotherapie oder einer Radiochemotherapie und die Entwicklung eines Modells zur Vorhersage intolerabler klinischer Toxizitäten. Dabei wird die Hypothese verfolgt, dass die genetische Variabilität in Genen, deren Produkte an der Regulierung der Strahlenreaktion beteiligt sind, entscheidend an der unterschiedlichen

klinischen Behandlungsreaktion von Patienten beteiligt ist. Zur Prüfung der Hypothese sollen genetische Varianten in Form von Polymorphismen mit der klinischen Reaktion und biologischen Endpunkten korreliert werden. In die klinische Reaktion gehen akute und späte Nebenwirkungen, der Organerhalt, die Lebensqualität und die histopathologische Tumorantwort ein. Zu den biologischen Endpunkten gehören der zelluläre Stoffwechsel der Chemotherapeutika (5-FU, Oxaliplatin) und die Verarbeitung des therapieinduzierten DNA-Schadens.

Ziel und Fragestellung der vorliegenden Arbeit war die vergleichende Prüfung zweier Endpunkte zur Erfassung therapieinduzierter DNA-Schäden. Als Endpunkte wurden die Chromosomenaberrationstechnik und der Mikronukleustest miteinander verglichen. Als geeignetes Untersuchungsmaterial wurden periphere Blutlymphozyten gewählt, da diese leicht zugänglich sind und ihre Gewinnung die Patienten wenig belastet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden etabliert und geprüft:

- die Integration der notwendigen Blutentnahmen zu definierten Zeitpunkten relativ zur Bestrahlung in der klinischen Routine
- die Häufigkeit der Gewinnung sicher auswertbarer Präparate mittels der beiden Techniken
- die Höhe der Ausbeuten an Chromosomenaberrationen bzw. Mikronuklei vor einer Therapie, nach in-vitro-Behandlung und im Verlauf der Therapie
- die Äquivalenz zwischen der Chromosomenaberrationstechnik und dem Mikronukleustest.

Des Weiteren wurde der Effekt der einzelnen Chemotherapiekomponenten auf die Bildung von Mikronuklei *in vitro* analysiert und mit dem Mikronukleustest die Vitalität der Lymphozyten im Therapieverlauf geprüft und mit klinischen Laborparametern verglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Antikörper und Zellen

Alle Lösungen, Medien und Puffer wurden mit zweifach destilliertem Wasser (Reinstwasser) angesetzt.

*Tabelle 4: Chemikalien*

|  |               |  |
|--|---------------|--|
| Colcemid<br>Ref.No. 15212-046<br>Lot.No. 1279148   | GIBCO         | Auckland, N.Z.<br>Paisley, Scotland, U.K.<br>Grand Island, N.Y., USA |
| Cytochalasin B, C6762-5MG  | Sigma         | Steinheim, Deutschland   |
| DMSO Lot.No. 66K2318   | Sigma-Aldrich | Steinheim, Deutschland   |
| Eisessig   | Merck         | Darmstadt, Deutschland   |
| Fetales Kälber Serum, Katalog-Nr. S0115  | Biochrom AG   | Berlin, Deutschland  |
| Glucose Kat.Nr. G 7021   | Sigma         | Steinheim, Deutschland   |
| Kaliumchlorid (KCl), 2,8 g KCl und 500 ml<br>Aqua bidest (entspricht 0,56 M KCl) auf 37°C<br>erwärmt | Merck         | Darmstadt, Deutschland   |
| Methanol   | Merck         | Darmstadt, Deutschland   |
| NaCl   | Merck         | Darmstadt, Deutschland   |
| Phytohämagglutinin ( PHA )<br>Cat.No. 10576-015<br>Lot.No. 1303268                                   | GIBCO         | Auckland, N.Z.<br>Paisley, Scotland, U.K.<br>Grand Island, N.Y., USA |
| Streptomycin/Penicillin, Katalog-Nr. A2213   | Biochrom AG   | Berlin, Deutschland  |

## 2.1.2 Medien und Puffer

### 2.1.2.1 Medien

Das nachfolgend aufgeführte Medium wurde mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt und danach durch Sterilfiltrieren sterilisiert.

RPMI: Roswell Park Memorial Institute (mit Phenolrot, Katalog-Nr. 1640, Biochrom, Berlin, D). 7,13 g Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) als Puffer (Merck Art. Nr.: 6329), 25 ml Penicillin (10000IE) und Streptomycin (10000 $\mu\text{l/ml}$ ) (Biochrom Art. Nr.: A 2213) als Antibiotika, 11,92 g HEPES-Puffer (Biochrom Art. Nr.: L 1603) und 12,5 g Glucose (Sigma Kat. Nr.: G 7021) sowie 10% hitzeinaktiviertes (40 Min. bei 56°C) fetales Kälberserum (Fa. Biochrom Art.: S 0115).

### 2.1.2.2 Puffer und Lösungen

*Tabelle 5: Puffer und Lösungen*

|   |  |
|---|--|
| Biocoll Separating Solution                       | Biochrom AG  |
| Cytochalasin-B Mix I                              | Stock: 600 $\mu\text{g/ml}$ DMSO<br>Stock: RPMI 1640 = 1:9<br>75 $\mu\text{l}$ Mix I/ml RPMI 1640 $\rightarrow$ 4,5 $\mu\text{g/ml}$ |
| Diff-Quik-Färbeset<br>Ref. 130832<br>Lot. 460.050 | Medion Diagnostics GmbH, Düdingen, Schweiz   |
| Diff-Quik-I-Färbelösung                           | Eosin Y (1,22 g/l) in Phosphatpuffer (pH 6,6) und 0,1% (g/v)<br>Natriumazid als Konservierungsmittel                                 |
| Diff-Quik-II-Färbelösung                          | Thiazin-Farbstoff (1,1 g/l) in Phosphatpuffer (pH 6,6)   |
| Fixativ: Eisessig 1: Methanol<br>3                | Merck, Darmstadt, Deutschland  |
| Giemsa-Färbelösung<br>Lot.No. OB337141            | Merck, Darmstadt, Deutschland  |
| HEPES-Puffer (4-(2-                               | Biochrom AG, Art.Nr.: L 1603   |

|  |   |
|--|---|
| Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure) |   |
| Natriumhydrogencarbonat                    | Art.Nr.: 6329 Merck, Darmstadt, Deutschland |

### 2.1.3 Geräte

Tabelle 6: Geräte

|   |                                      |                         |
|---|--------------------------------------|-------------------------|
| Brutschrank (37°C, 5% CO <sub>2</sub> ), Heraeus          | Heraeus                              | Hanau, Deutschland      |
| Cytospin 2, Shandon<br>Cat.No. 59900101<br>Serial: 579512 | Shandon<br>Southern<br>Products Ltd. | Astmoor, England        |
| Inverses Phasenkontrastmikroskop „Telaval 31“             | Zeiss                                | Göttingen, Deutschland  |
| Lichtmikroskop Standard 18                                | Zeiss                                | Göttingen, Deutschland  |
| Linearbeschleuniger                                       | Varian                               | Palo Alto, USA          |
| Pipetten Eppendorf Research mit Spitzen                   | Eppendorf                            | Hamburg, Deutschland    |
| Pipettierhilfen Pipetboy acu, plus                        | Integra<br>Biosciences               | Chur, Schweiz           |
| Reinwassergerät, arium 611 VF                             | Sartorius                            | Göttingen, Deutschland  |
| Sterile Werkbank, Hera-Safe, Airflow                      | Heraeus                              | Hanau, Deutschland      |
| Sterilisator  | Memmert                              | Schwalbach, Deutschland |
| Trockenschrank  | Memmert                              | Schwalbach, Deutschland |
| Vortexer MS1 Minishaker                                   | IKA                                  | Taquara, Brasilien      |
| Wärmebad  | GFL                                  | Burgwedel, Deutschland  |
| Zentrifuge Megafuge 1.0R                                  | Heraeus<br>Sepatech                  | Berlin, Deutschland     |

### 2.1.4 Zubehör

Tabelle 7: Zubehör

|  |          |                           |
|--|----------|---------------------------|
| 3,5-ml-Einmal-Pasteur-Pipetten, Cat-Nr. 861172 | Sarstedt | Nümbrecht,<br>Deutschland |
|--|----------|---------------------------|

|  |  |                               |
|--|--|-------------------------------|
| 50-ml-Röhren, Nr. 62.547.004   | Sarstedt                                     | Nümbrecht,<br>Deutschland     |
| Eppendorf-Cups   | Eppendorf-Nether-<br>Hinz<br>GmbH            | Hamburg,<br>Deutschland       |
| Filterpapier Shandon Filter Cards Thick, White,<br>Ref. 5991022                              | Thermo Scientific                            | Waltham, USA                  |
| Gewebekulturflaschen „Cellstar“, Nr. 658175,<br>75 cm <sup>2</sup> , 250 ml mit Filterkappen | Greiner Bio-One                              | Frickenhausen,<br>Deutschland |
| Gewebekulturflaschen, Nr. 152094,<br>25 cm <sup>2</sup> , 40 ml mit Filterkappen             | Nunc   | Roskilde,<br>Dänemark         |
| Glas-Pasteur-Pipetten, Cat-Nr. 747720  | Brand  | Wertheim,<br>Deutschland      |
| Hautdesinfektionsmittel, Alkoholisches<br>Hautantiseptikum Kodan® Tinktur forte farblos      | Schülke & Mayr<br>GmbH                       | Norderstedt,<br>Deutschland   |
| Leucosep Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen  | Greiner Bio-One                              | Frickenhausen,<br>Deutschland |
| Li-Heparin-S-Monovette®, 7,5 ml  | Sarstedt                                     | Nümbrecht,<br>Deutschland     |
| Multifly®-Kanüle mit Adapter   | Sarstedt                                     | Nümbrecht,<br>Deutschland     |
| Objektträger 76x26 mm  | Waldemar Knittel<br>Glasbearbeitungs<br>GmbH | Braunschweig,<br>Deutschland  |
| Pipetten steril, 2 ml, 10 ml, 25 ml  | Sarstedt                                     | Nümbrecht,<br>Deutschland     |
| Polypropylen-Röhrchen, 15 ml, Nr. 188271   | Greiner Bio-One                              | Frickenhausen,<br>Deutschland |
| S-Monovette®-Kanüle  | Sarstedt                                     | Nümbrecht,<br>Deutschland     |
| Sterilfilter Minisart 2000, Nr. 17805  | Sartorius                                    | Göttingen                     |
| Sterilfilter Minisart N, Nr. 17597 K   | Sartorius                                    | Göttingen                     |
| Zählkammer 0,0025 mm <sup>2</sup> , (Neubauer improved)                                      | Brand  | Wertheim,                     |



|   |                 |                            |
|---|-----------------|----------------------------|
|   |                 | Deutschland                |
| Zentrifugenröhrchen aus Polyesterol, „Test Tubes“ 16,5/103, Art.Nr. 172101, Lot.Nr. 0970502 | Greiner Bio-One | Frickenhausen, Deutschland |

### 2.1.5 Software

Tabelle 8: Software

|                                    |                   |                 |
|------------------------------------|-------------------|-----------------|
| Excel, Version 2004 für Mac 11.3.7 | Microsoft         | Redmond, USA    |
| Free software R, Version 2.6       | www.r-project.org | Vienna, Austria |
| KaleidaGraph, Version 3.5          | Synergy Software  | Reading, USA    |
| SAS, Version 9.1                   | SAS Institute     | Cary, USA       |
| Word, Version 2004 für Mac 11.3    | Microsoft         | Redmond, USA    |

## 2.2 Patienten

Die Patienten wurden aus der laufenden CAO/ARO/AIO-04-Studie rekrutiert (1.1.3) und die Gewinnung der Proben im Rahmen des wissenschaftlichen Programms des Subprojektes 6 der Klinischen Forschergruppe 179 (1.1.4) etabliert. Sowohl die CAO/ARO/AIO-04-Studie als auch die Untersuchungen durch die KFO 179 und insbesondere auch die Untersuchungen im Rahmen des Subprojektes SP6 wurden im Vorfeld durch die Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen geprüft und genehmigt. Alle Patienten nahmen nach ausführlicher Aufklärung freiwillig an der CAO/ARO/AIO-04 Studie sowie den Begleituntersuchungen der KFO 179 inklusive der Untersuchungen des SP6 teil.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 24 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom untersucht, von denen 9 weiblich und 15 männlich waren. Der Altersmedian betrug 62,5 Jahre, das Maximum lag bei 81 Jahren, das Minimum bei 45 Jahren. Bei 16 Patienten lag ein UICC-Stadium III vor, bei 8 Patienten ein UICC-Stadium II. 15 Patienten erhielten eine Therapie nach Arm A, 9 nach Arm B. In beiden Therapiearmen wird mit einer Gesamtdosis von 50,4 Gy bei 28 Fraktionen à 1,8 Gy fünf Mal pro Woche bestrahlt.

Arm-A-Patienten erhalten in der ersten (Tag 1-5) und fünften Behandlungswoche (Tag 29-33) eine 120-Stunden-Dauerinfusion Fluorouracil (5-FU) in einer Dosierung von 1000mg pro m<sup>2</sup> Körperoberfläche pro Tag.

Arm-B-Patienten erhalten an den Tagen 1, 8, 22 und 29 eine 2-Stunden-Dauerinfusion Oxaliplatin in einer Dosis von 50 mg pro m<sup>2</sup> Körperoberfläche in 500 ml Glukose 5%. An den Tagen 1-14 und 22-35 wird Fluorouracil (5-FU) mit einer Dosierung von 250mg pro m<sup>2</sup> Körperoberfläche pro Tag als Dauerinfusion appliziert.

Keiner der Patienten war starker Raucher oder Trinker, auch andere mögliche zytotoxische Ereignisse wie z.B. RTX wurden vor Beginn der Therapie ausgeschlossen.

Zur Festlegung des UICC-Stadiums war folgendes diagnostische Vorgehen obligat: Histologische Sicherung des fortgeschrittenen RC bis 12 cm von der Anokutanlinie (Messung mit einem starren Rektoskop), endosonographisch oder computer-/magnetresonanztomographisch beschriebenes RC im Stadium T3-4 oder N+ ohne begleitende Fernmetastasen (Ausschluss durch Abdomensonographie und Röntgen-Thorax). In Tabelle 9 sind einige Patientencharakteristika zusammengefasst.

*Tabelle 9: Patientencharakteristika*

| <b>Patient</b> | <b>Alter</b> | <b>Geschlecht</b> | <b>Therapiearm</b> | <b>UICC Stadium</b> |
|----------------|--------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| 1              | 69           | F                 | B                  | III                 |
| 2              | 51           | F                 | B                  | III                 |
| 3              | 69           | M                 | B                  | III                 |
| 4              | 62           | M                 | A                  | III                 |
| 5              | 48           | M                 | A                  | II                  |
| 6              | 54           | M                 | A                  | II                  |
| 7              | 54           | F                 | A                  | II                  |
| 8              | 47           | F                 | B                  | III                 |
| 9              | 61           | M                 | A                  | III                 |
| 10             | 71           | F                 | A                  | III                 |
| 11             | 60           | F                 | B                  | III                 |
| 12             | 45           | M                 | A                  | III                 |
| 13             | 60           | M                 | A                  | III                 |
| 14             | 81           | M                 | A                  | III                 |
| 15             | 49           | M                 | A                  | III                 |
| 16             | 73           | F                 | A                  | III                 |
| 17             | 72           | M                 | A                  | III                 |
| 18             | 49           | M                 | B                  | III                 |
| 19             | 63           | M                 | B                  | III                 |
| 20             | 71           | M                 | B                  | II                  |
| 21             | 63           | M                 | A                  | II                  |
| 22             | 76           | F                 | A                  | II                  |
| 23             | 64           | M                 | B                  | II                  |
| 24             | 76           | F                 | A                  | II                  |

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Allgemeines

#### 2.3.1.1 Blutentnahmen

Jedem Patienten wurde zu drei festgelegten Zeitpunkten Blut entnommen: Vor Beginn der neoadjuvanten Therapie, nach der 12. Bestrahlungsfraction (21,6 Gy) und am letzten Therapietag nach der 28. Bestrahlungsfraction (50,4 Gy). Zusätzlich zu den Blutproben der Studienpatienten wurden Blutproben von einem gesunden Spender entnommen zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve. Dies diente insbesondere dem Zweck, die Mikronukleusmethode zu etablieren (die Chromosomenaberrationstechnik wurde von Frau Prof. Virsik (Abteilung Allgemeine Hygiene und Umweltmedizin) betreut und kontrolliert) und um an Hand der erhaltenen Werte eine sinnvolle *in-vitro*-Bestrahlungsdosis festlegen zu können.

Die Blutentnahme zur Gewinnung der heparinisierten Vollblutproben wurde mittels Punktion der Armvene durchgeführt. Bei Punktion der Armvene wurde das Blut steril über ein geschlossenes Blutentnahmesystem bestehend aus S-Monovette®-Kanüle oder Multifly®-Kanüle mit Adapter und Li-Heparin-S-Monovette® entnommen.

#### 2.3.1.2 Vollblut

Zum ersten Zeitpunkt wurden 45 ml heparinisiertes Vollblut entnommen. Jeweils 22 ml des heparinisierten Blutes wurden mit einer Dosis von 3 Gy bestrahlt – 10 ml für die Mikronukleuspräparate, 12 ml für die Chromosomenpräparate. Die bestrahlten 10 ml heparinisiertes Blut für die Mikronukleuspräparate wurden 44 Stunden kultiviert, weitere 10 ml wurden als unbestrahlte Kontrolle ebenfalls 44 Stunden kultiviert und im weiteren Verlauf wie die bestrahlten Proben bearbeitet. Von den bestrahlten 12 ml des heparinisierten Blutes für die Chromosomenpräparate wurden je 6 ml 48 bzw. 50 Stunden kultiviert, weitere 6 ml wurden als unbestrahlte Kontrolle 48 Stunden kultiviert und im weiteren Verlauf genau wie die bestrahlten Proben bearbeitet.

Am zweiten und am dritten Zeitpunkt wurden 30 ml heparinisiertes Vollblut entnommen, 10 ml für die Mikronukleuspräparate, jeweils 6 ml für die 48 bzw. 50 Stunden - Kultivierung für die Chromosomenpräparate. Diese Proben wurden genauso bearbeitet wie die Proben am ersten Zeitpunkt.

Das Patientenblut wurde zur Mikronukleuspräparation spätestens vier Stunden, zur Chromosomenpräparation spätestens 24 Stunden nach Punktion verarbeitet. Bis zur Verarbeitung wurde es im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Zusätzlich zu dem Blut, welches zur Herstellung der Chromosomen- und Mikronukleuspräparate benötigt wurde, sind zur Bestimmung der Leukozyten- und Lymphozytenwerte zu jedem Zeitpunkt Proben abgenommen worden.

### **2.3.1.3 Experimentelle Bestrahlungen**

Die Bestrahlung des Vollblutes bis 3 Gy wurde mit einem Linearbeschleuniger Clinac 600 C/D der Firma Varian (Palo Alto, USA) durchgeführt. Es wurden Photonen mit 6 MV eingesetzt bei einer Dosisrate von 2,4 Gy pro Minute. Zum Dosisaufbau wurden die zu bestrahlenden Polypropylenröhrchen in ein Plexiglasphantom gestellt und die Gantry in 270° Position gefahren. Die Feldgröße betrug 24 x 24 cm, der Abstand zwischen Fokus und Plexiglasplatte 100 cm. Eine Dosimetrieberechnung erfolgte durch die Physiker der Klinik für Strahlentherapie, Universitätsmedizin Göttingen.

## **2.3.2 Methodik Chromosomen - Präparate**

### **2.3.2.1 Lymphozyten - Zellkulturen**

Das bestrahlte Blut wurde an einer sterilen Werkbank im Verhältnis 1:9 mit dem RPMI-Nährmedium in einer Zellkultuflasche vermischt, in die 100 µl PHA/ml Blut zur Teilungsaktivierung der Lymphozyten hinzugefügt wurde. Die Lymphozytenkulturen wurden dann für 48 bzw. 50 Stunden zur Kultivierung in einen Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gestellt. Ziel war es hierbei, möglichst viele Lymphozyten zur Teilung zu aktivieren. Granulozyten sterben während der Kultivierung bei dem vorliegenden Milieu ab.

Die optimale Kulturzeit war bereits in Vorversuchen bestimmt worden und die Daten lagen in der Abteilung vor (Kühnle, 2007).

### 2.3.2.2 Metaphase – Präparate für die CAA

Zwei Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 200 µl Colcemid/ml Blut zu den Kulturen dazu pipettiert, um das Wachstum während der ersten Mitose in der Metaphase zu stoppen. Colcemid ist ein Spindelgift und verursacht einen Kondensationseffekt. Die Spindelfasern sterben ab und das Auseinanderweichen der Schwesterchromatiden wird verhindert.

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellkulturen auf gekennzeichnete (Probennummer, Probenart, Datum) 10 ml Zentrifugenröhrchen aus Polysterol verteilt, bei 1200 UpM (RT) 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand dann mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Unter Vortexen wurden die Proben in den Zentrifugenröhrchen mit 7 ml hypotoner KCl (auf 37°C erwärmt) (erst 4 ml tropfenweise, dann 3 ml im Schuss) resuspendiert, um die geplatzten Erythrozyten nach anschließender Zentrifugation (1200 UpM, 10 Min., RT) als Überstand mit einer Pipette entfernen zu können. Das Hinzufügen in Tropfenform ist notwendig, um ein Zerschneiden der Metaphasezellen zu verhindern. Die Salzkonzentration der Kaliumchlorid-Lösung außerhalb der Zellmembran der Lymphozyten ist niedriger („hypoton“) als innerhalb der Zellmembran. Durch den Effekt der Osmose wird das Zellvolumen erhöht, da Wasser durch die Zellmembran in das Innere der Zelle fließt. Das vergrößerte Zellvolumen schafft den Chromosomen mehr Platz. Sie können sich besser ausbreiten. Das Chromatin quillt und wird besser sichtbar gemacht. Durch Erwärmung des KCl auf 37°C wird dieser Effekt erhöht, da der Wassertransport beschleunigt wird. Die kernlosen Erythrozyten platzen durch die Zugabe des KCl und werden während der Behandlung beseitigt.

Im nächsten Schritt wurde unter Vortexen 7 ml Fixativ (Eisessig:Methanol = 1:3) hinzugegeben. Nach Zentrifugation (1200 UpM, 10 Min., RT) wurde das Gemisch dekantiert. Dieser Schritt wurde ein Mal wiederholt. Die Fixierung ist ein Konservierungsprozess: Die Gewebestruktur wird konserviert, der Verlust von Nukleinsäuren verhindert. Die Aktivität endogener Nukleasen und anderer gewebsabbauender Enzyme wird durch Denaturierung (Senkung des pH-Wertes) vermindert. Die Zelle wird dehydriert und das Wasser im Zellinnern durch Methanol ersetzt. Zellmembran und Chromatin werden gehärtet und die Chromosomen für die folgende Färbung präpariert. Nach Fixierung kann man die Zellen über Wochen im Tiefkühlschrank aufheben.

Im letzten Schritt wurden nacheinander das erste und das zweite Zentrifugenröhrchen unter Vortexen mit einer 3,5-ml-Einmal-Pasteurpipette Fixativ befüllt. Die Suspension wurde dann aus dem zweiten Zentrifugenröhrchen mit einer 3,5-ml-Einmal-Pasteurpipette entnommen und das dritte Zentrifugenröhrchen wurde dann unter Vortexen mit der Flüssigkeit aus dem zweiten Zentrifugenröhrchen befüllt. Das vierte dann mit der Flüssigkeit aus dem dritten Zentrifugenröhrchen usw. bis zum sechsten Zentrifugenröhrchen, dessen Inhalt dann dem ersten Zentrifugenröhrchen hinzugefügt wurde.

Mit einer weiteren mit Fixativ befüllten 3,5-ml-Einmal-Pasteurpipette wurden die Zentrifugenröhrchen 2-6 nacheinander ausgespült, wobei das Volumen nach Ausspülen des zweiten Röhrchens zum Ausspülen des dritten Röhrchens benutzt wurde, das Volumen des dritten Röhrchens zum Ausspülen des vierten Röhrchens usw. Der Inhalt des sechsten Zentrifugenröhrchens wurde dann dem ersten Zentrifugenröhrchen hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation des ersten Zentrifugenröhrchens wurde der Überstand mit einem Ruck abgekippt, das verbleibende Zellpellet mit einer 3,5-ml-Einmal-Pasteurpipette Fixativ aufgefüllt und bis zum Aufbringen auf den Objektträger (OT) im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

### **2.3.2.3 Objektträger mit Metaphasenpräparaten und Giemsa-Färbung**

Von dem Fixativ des fixierten Zellpellets wurden einige 100 µl mit einer Pipette und mit frischem Fixativ durch Ansaugen und Entleeren der Pipette resuspendiert. Es entsteht eine Suspension. Der OT wurde mit Probennummer, Probenart und Datum versehen. Er wurde mit Alkohol (70%) gereinigt und war vollständig sauber, um eine gleichmäßige Verteilung der Suspension zu gewährleisten. Er wurde flach auf den Tisch gelegt und mit einer mit bidestilliertem Wasser befüllten Pasteurpipette benetzt. Feuchtigkeit auf dem OT erleichtert das Spreiten der Chromosomen durch das unmittelbare Zurückweichen des Wassermeniskus, sobald Fixativ auf das Wasser trifft. Die dabei entstehende Energie der Dehydration drückt die Metaphase auseinander. Spreiten bedeutet, dass die Chromosomen einer Zelle im entstandenen Metaphasepräparat nebeneinander auf dem OT liegen und dadurch gut ausgezählt und miteinander verglichen werden können.

25 µl der Suspension wurden nach Aufstellen des OT in einem 45° Winkel entlang der langen Achse mittig pipettiert. Das zurückweichende Wasser wurde entfernt, eventuell mit Fixativ

abgespült. Der OT wurde dann im 45° Winkel an einem staubfreien Ort bei Zimmertemperatur getrocknet.

12 Stunden später wurde der OT 10 Min. in einer Küvette mit 3%iger Giemsa-Lösung gefärbt, dann mit Wasser abgespült und luftgetrocknet. Die Giemsa-Färbung ist benannt nach Gustav Giemsa, der die Romanowsky-Färbung für methanolfixierte zytologische Präparate modifizierte. Sie besteht aus einer Mischung der Farbstoffe Methylenblau-Eosinat, Azur A- und B-Eosinat, sowie Methylenblauchlorid in Methanol mit Glycerin als Stabilisator.

#### **2.3.2.4 Mikroskopische Auswertung**

Die Auswertung der Giemsa-gefärbten Chromosomen-Präparate wurde an einem Lichtmikroskop durchgeführt. Auf dem OT wurden zunächst Häufigkeit und Vollständigkeit der Mitosen, sowie ausreichende Kondensation und Abgrenzbarkeit der Chromosomen voneinander geprüft. Die Auswertung der Chromosomenaberrationen muss in der ersten Mitose nach Bestrahlung erfolgen, da es sonst zu einem Verlust aberranter Chromosomen kommen kann. Die ersten Mitosen nach Bestrahlung treten innerhalb 38 bis 60 Stunden nach Bestrahlung auf. Anhand der vorliegenden Vorversuche aus der Abteilung konnte so eine optimale Kulturzeit festgelegt werden (Kühnle 2007). Angestrebt wurde in den Kulturen ein Maximum zweiter Mitosen kleiner gleich 8%. Die unbestrahlten Blutproben zum ersten Zeitpunkt wurden nach 48 Stunden Kultivierung untersucht, alle bestrahlten Proben nach 48 oder 50 Stunden Kultivierung.

Die Auswertungen erfolgten an einem Lichtmikroskop mit einer 1000 fachen Vergrößerung unter Ölimmersion. Im Laufe der Auswertung wurden, in Abhängigkeit von den oben beschriebenen Kriterien der Präparate, weitere OT angefertigt, sodass pro Zeitpunkt und pro bestrahltem, bzw. unbestrahltem Präparat im Idealfall 200 Mitosen ausgezählt wurden. Dies konnte nicht immer realisiert werden, da im Laufe der neoadjuvanten Therapie die Anzahl der Lymphozyten mit Mitosen immer mehr abnahm (Tabelle 18). Frequenzen von DC, AF und weitere Auffälligkeiten wurden notiert.

### 2.3.3 Methodik Mikronukleus - Präparate

#### 2.3.3.1 Isolierung der Lymphozyten und Kultivierung

Zur Isolierung der Lymphozyten wurden Leucosep®-Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit einer Polyethylen-Trennscheibe verwendet. Die Leucosep-Zentrifugenröhrchen wurden vor Gebrauch mit 3-ml-Biocoll-Separationsmedium befüllt und dann für 30 sec. bei 1000 x g (2400 UpM) und RT zentrifugiert, um das Biocoll-Separationsmedium unterhalb der Trennscheibe zu positionieren.

Das heparinisierte Vollblut wurde mit Kochsalzlösung verdünnt (Blut:NaCl (0,9%) = 1:2) und jeweils 6 ml der Blut-Kochsalzlösung wurden vorsichtig in fünf Leucosep®-Zentrifugenröhrchen auf die Trennscheibe gegeben. Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (15 Min. bei 2400 UpM und RT mit Ausschwingrotor ohne Bremse) bildeten sich dann sechs Schichten von oben nach unten: a) Plasma – b) angereicherte Zellfraktion (Interphase aus Lymphozyten/periphere mononukleäre Zellen (PBMC) – c) Separationsmedium – d) Trennscheibe – e) Separationsmedium – f) Pellet (Erythrozyten und Granulozyten) (Abbildung 6).

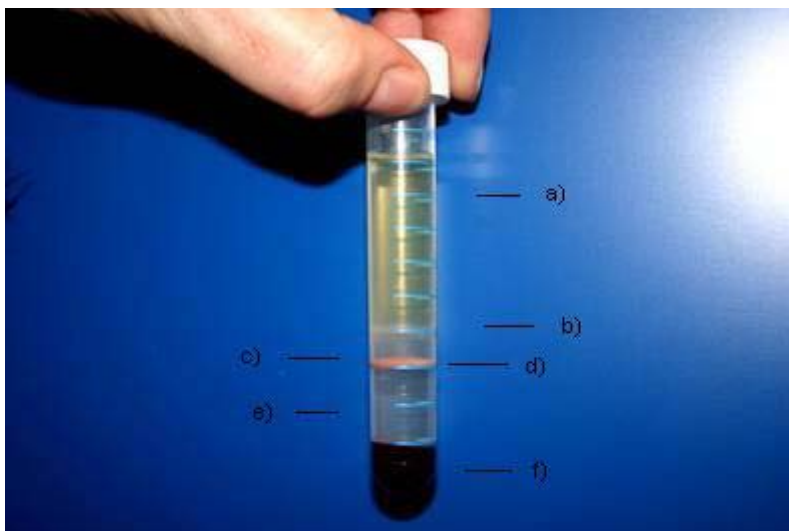


Abbildung 6: Schichtung nach Dichtegradienten-Zentrifugation: a) Plasma – b) angereicherte Zellfraktion (Interphase aus Lymphozyten/periphere mononukleäre Zellen (PBMC) – c) Separationsmedium – d) Trennscheibe – e) Separationsmedium – f) Pellet (Erythrozyten und Granulozyten)

Die Plasmafraktion jedes Leucosep®-Zentrifugenröhrchens wurde bis auf eine Schichtdicke von 5-10 mm abgenommen, um eine Kontamination der Lymphozyten/PBMC mit den



Thrombozyten zu vermeiden. Die Interphasen wurden mit einer Pipette in eine Gewebekulturflasche überführt und mit RPMI-Nährmedium auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurden zur Teilungsaktivierung der Lymphozyten 500 µl PHA hinzugegeben. Nach 44 Stunden Kultivierung im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen in der Gewebekulturflasche mit einer Pipette resuspendiert und unter sterilen Bedingungen in ein 50-ml-Röhrchen überführt. Einige Mikroliter wurden mit einer Glas-Pasteurpipette entnommen und eine Zellkammer damit befüllt. Auf der Zellkammer wurde zuvor mit einigen Tropfen Wasser ein Deckglas fixiert. Die befüllte Pipettenspitze wurde auf die Zellkammer an den Rand des Deckglases geführt, sodass der Inhalt sich unter dem Deckglas auf der Zellkammer verteilen konnte. Die Lymphozyten auf der Zellkammer wurden dann auf einem inversen Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Bei einem Phasenkontrastmikroskop müssen die untersuchten Proben nicht eingefärbt sein. Man kann lebende Zellen mittels ihrer unterschiedlichen Brechzahlen in Bezug auf das umgebende Medium besser darstellen. Bei einem inversen Mikroskop ist das Objektiv unter dem Objektisch angebracht. Die Lichtquelle strahlt von oben auf das zu untersuchende Objekt. Der vergrößerte Raum zwischen Beleuchtungseinheit und Objektisch ermöglicht das Mikroskopieren durch Wände von Laborgefäßen oder Zählkammern.

Das 50-ml-Röhrchen wurde dann zentrifugiert (1200 UpM, 8 Min., RT), sodass sich am Boden ein Zellpellet bildete. Das Nährmedium wurde dann bis auf 10 ml abgenommen. Die 10 ml wurden resuspendiert, umgefüllt in eine Zellkulturflasche und mit 750 µl Cyt-B Mix I zur Arretierung der Zellen in der Metaphase dazu pipettiert.

Der Stock des Cyt-B Mix I wurde hergestellt aus 600 µg Cyt-B/ml Dimethylsulfoxid (DMSO) und lagerte in kristalliner Form bei 4°C. Er wurde vor Gebrauch bei RT verflüssigt und mit RPMI im Verhältnis 1:9 zum Cyt-B Mix I verdünnt. Die Endkonzentration des Cyt-B betrug in Lösung somit 4,5 µg/ml.

Nach weiteren 28 Stunden im Brutschrank wurden die, auf der Zählkammer ausgezählten Lymphozyten auf eine Dichte von 30.000 und 15.000 Zellen/100 µl verdünnt. Dafür wurden die 10 ml aus der Gewebekulturflasche in ein 50-ml-Röhrchen pipettiert und ggf. zentrifugiert (1200 UpM, 8 Min., RT), sodass man, in Abhängigkeit von der ausgezählten Lymphozytenzahl, Nährmedium zur Erhöhung der Lymphozytenzahl pro 100 µl abnehmen konnte. Die resultierende Konzentration von 30.000 Lymphozyten/100 µl Nährmedium musste dann nur noch im Verhältnis 1:1 mit frischem RPMI-Nährmedium verdünnt werden, um eine Konzentration von 15.000 Zellen/100 µl zu erhalten.

### **2.3.3.2 Cytospin**

Eine Cytospin ist eine Zentrifuge, die es erlaubt, Zellmonolayer auf OT zu bringen, bei gleichzeitigem Erhalt der Zellintegrität. Sie liefert eine gute Darstellung aller in homogenen Flüssigkeiten vorhandenen Zelltypen. Mit Hilfe von Zentrifugalprinzipien werden Zellen auf einen definierten Bereich des OT sedimentiert und zur guten Zellkerndarstellung zudem abgeflacht.

Der OT wird in den OT-Halter gelegt. Darüber wird eine Filterkarte mit einem Loch gelegt, die die Restflüssigkeit absorbiert. Auf die Filterkarte wird ein Cytofunnel® geklemmt. Der Cytofunnel® ist ein Trichter, der über einen kleinen Kanal mit dem OT verbunden ist. Durch die Zentrifugalkraft werden die Zellen innerhalb von 10 Min. bei 1500 UpM vom Cytofunnel® über den Kanal auf den OT gebracht.

### **2.3.3.3 Mikronukleuspräparate**

Der Trichter wurde mit 100 µl des Nährmediums mit den Zellen befüllt. Zwölf Cytofunnel® mit Probenkammer haben Platz in der Cytospin, zehn wurden befüllt. Je fünf mit einer Zellzahl von 30.000 bzw. 15.000 Zellen pro 100 µl. Die OT wurden zuvor mit Probennummer, Probenart, Datum und Zellzahl beschriftet.

### **2.3.3.4 Färbung der Mikronukleuspräparate**

Die OT wurden aus der Cytospin entnommen und 10 Min. getrocknet. Zur Zellfixation wurden die OT für weitere 10 Min. in eine Küvette mit Methanol gestellt. Zwei Färbeküvetten wurden mit Diff-Quik I® und Diff-Quik II® befüllt, eine weitere Küvette wurde mit bidestilliertem Wasser befüllt. Diff-Quik® ist eine Schnellfärbemethode, deren Ergebnisse mit denen der Pappenheim-Methode (Giemsa-May-Grünwald) gut vergleichbar sind.

Die OT wurden 5 x für eine Sekunde in Diff-Quik I® eingetaucht, zwischendurch abtropfen gelassen. Dann 5 x eine Sekunde in Diff-Quik II® eingetaucht, zwischendurch abtropfen gelassen. Zum Spülen wurden die OT in das bidestillierte Wasser eingetaucht. Anschließend wurden die OT an einem staubfreien Ort bei Zimmertemperatur 10 Min. getrocknet.

### 2.3.3.5 Mikroskopische Auswertung der Mikronukleuspräparate

Die Auswertung der gefärbten Mikronukleuspräparate erfolgte an einem Lichtmikroskop mit 1000 facher Vergrößerung und Ölimmersion. Ausgezählt wurden die Präparate pro Dosis pro Patient solange, bis 1000 binukleäre Lymphozyten (BLZ) registriert wurden. Zur Bestimmung des zytogenetischen Schadens wurden dabei alle BLZ notiert, alle Mikronuklei innerhalb von BLZ, alle BLZ mit Brücken (Abbildung 7). Außerdem wurden zur Bestimmung des Nuclear Division Index (NDI) zusätzlich alle mononukleären, trinukleären und tetranukleären Lymphozyten pro 1000 BLZ registriert (Tabelle 20, Tabelle 21, Tabelle 22, Tabelle 23, siehe Anhang).

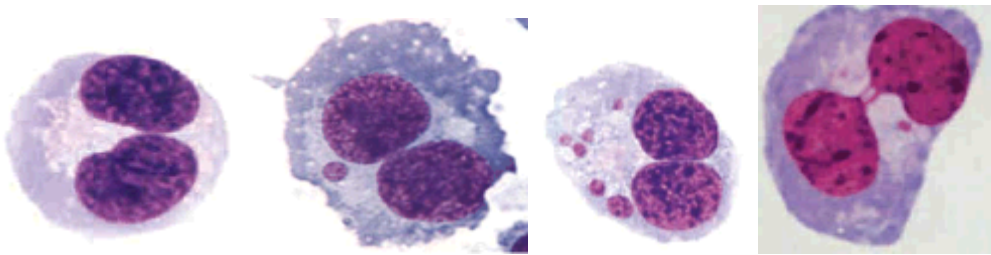


Abbildung 7: Von links nach rechts: 1) Binukleärer Lymphozyt (BLZ), 2) BLZ mit einem Mikronukleus, 3) BLZ mit multiplen Mikronuklei, 4) BLZ mit Mikronukleus und Nukleoplasmabrücke (Fenech et al. 2003)

Kriterien zur Auswahl von BLZ bei der ZBT (Abbildung 8):

- a) Die Zellen müssen zweikernig sein.
- b) Die zwei Kerne sollten eine intakte Membran haben und innerhalb des gleichen Zytoplasmas situiert sein.
- c) Die zwei Kerne sollte annähernd die gleiche Größe und das gleiche Färbemuster bzw. -helligkeit haben.
- d) Die beiden Kerne können durch eine Brücke verbunden sein, die nicht größer als  $\frac{1}{4}$  des Kerndurchmessers sein sollte (NPB).
- e) Die beiden Kerne dürfen sich berühren, sollten sich jedoch nicht überlappen. Die Zellmembranen sollten dabei immer gut voneinander unterschieden werden können.
- f) Die Zellmembran einer BLZ sollte intakt und eindeutig differenzierbar von der nahegelegenen Zellmembran sein.

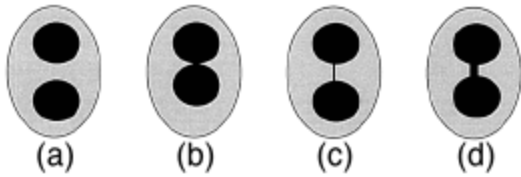


Abbildung 8: Beispiele zur Auswahl von binukleären Zellen (BLZ) in der Zytokinese-Block-Technik: a) ideale BLZ; b) BLZ mit sich berührenden Zellkernen; c) BLZ mit schmaler Nukleoplasmabrücke (NPB) zwischen den Zellkernen; d) BLZ mit breiter NPB zwischen den Zellkernen

MN sind morphologisch identisch, jedoch kleiner als die Zellkerne in den BLZ. Kriterien zur Auswahl von MN (Abbildung 9):

- a) Der Durchmesser von MN sollte zwischen  $1/16$  bis  $1/3$  des Zellkernes betragen.
- b) MN sind nicht einziehbar und können daher von Artefakten wie Färbungspartikel unterschieden werden.
- c) MN sind nicht mit einem der Zellkerne verbunden.
- d) MN können die Zellkerne berühren, jedoch nicht überlappen.
- e) Die MN-Membran sollte von der Zellkernmembran abgrenzbar sein.
- f) MN sollten die gleiche Färbungsintensität wie die Zellkerne haben.

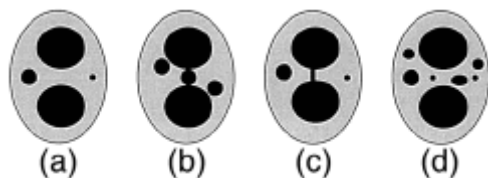


Abbildung 9: Beispiele zur Auswahl von Mikronuklei (MN): a) Binukleäre Zelle (BLZ) mit zwei MN,  $1/3$  bzw.  $1/9$  des Durchmessers des Zellkerns; b) MN, die die BLZ berühren, aber nicht überlappen; c) BLZ mit Nukleoplasmabrücke zwischen den Zellkernen; d) BLZ mit sechs MN unterschiedlicher Größe

Beispiele für zelluläre Strukturen, die MN ähneln, jedoch nicht durch Chromosomenbrüche oder -verlust entstanden sind und daher auch nicht als solche gewertet werden sollten, sind in Abbildung 10 dargestellt.

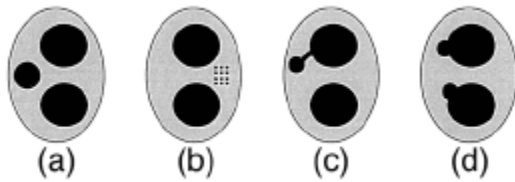


Abbildung 10: Mikronuklei (MN) - ähnliche Strukturen, die nicht als MN gewertet werden sollten: a) Trinukleäre Zelle (Durchmesser  $>1/3$  der Zellkerne); b) dichte Tüpfelung; c) platt gedrücktes Kernmaterial; d) Blasen, die eine Verbindung zum Zellkern haben

#### 2.4 *In-vitro*-Experiment zur Wirkung der Chemotherapie

In einem separaten *in-vitro*-Experiment wurde der Effekt der Chemotherapie auf den zytogenetischen Schaden getestet. Dabei wurde von 4 gesunden Spendern Blut entnommen und separat mit 5-FU bzw. Oxaliplatin versetzt. Die Einwirkzeit betrug für 5-FU 1h und 24h, für Oxaliplatin 2h und 25h. Angewandt wurde die ZBT und gemessen wurde die Zunahme der MN nach Einwirken der Chemotherapie.

#### 2.5 Statistische Methoden

Die Werte der AF, DC, MN und NPB bei 0 Gy wurden für den Vergleich der Methoden von denen bei 21,6 Gy und 50,4 Gy abgezogen, um den hinzugefügten Schaden beurteilen zu können. Die Anteile der zytogenetischen Schäden wurden zwischen den zwei Methoden (CAA, ZBT) sowie zwischen den beiden Dosiswerten (21,6 Gy, 50,4 Gy) verglichen. Hierzu wurde eine nichtparametrische, zwei-faktorielle Varianzanalyse für longitudinale Daten (Brunner et al., 2002) verwendet. Im Anschluss wurden nur die Methoden untereinander bzw. nur die Dosislevel untereinander mittels des Wilcoxon-Tests verglichen. Da eine Nichtablehnung der Nullhypothese „kein Unterschied zwischen den Methoden“ keine Äquivalenz beider Methoden impliziert, wurde der Äquivalenztest nach Westlake (Westlake, 1981) zum Vergleich der CAA und der ZBT durchgeführt. Ein Äquivalenztest setzt die Nullhypothese voraus, dass die wahre Differenz zwischen den Messungen zweier Gruppen höher ist als ein zuvor festgelegtes  $\epsilon$ . Wird die Nullhypothese abgelehnt, kann man eine Äquivalenz beider Methoden im Rahmen einer von  $\epsilon$  eingegrenzten Region annehmen. Das Signifikanzniveau wurde bestimmt als  $\alpha = 5\%$ , und die Äquivalenzregion mit  $\pm\epsilon = \pm 10\%$

festgelegt. Methoden- bzw. Dosisvergleiche, die sich an eine nicht signifikante Varianzanalyse anschlossen, wurden gemäß einem Bonferroni angepassten Signifikanzniveau durchgeführt ( $\alpha^* = 5\% / 3 = 1.67\%$ ).

Der zytogenetische Schaden von Arm-A- und Arm-B-Patienten wurde verglichen bei einer Dosis von 50,4 Gy mit dem Rangsummentest nach Wilcoxon. Die Spontanrate von MN beim Vergleich von postmenopausalen Frauen und Männern wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ausgewertet. Der Anstieg der zytogenetischen Schäden durch *in-vitro*-Bestrahlung bis 3 Gy wurde mit dem Rangsummentest nach Wilcoxon ausgewertet. Bei der Untersuchung des durch die Chemotherapie zugefügten Schadens im Blut wurde Wilcoxons *Matched-Pair-Test* verwendet.

Die Varianzanalyse wurde mit SAS (Version 9.1, SAS Institute) durchgeführt. Für alle anderen Analysen wurde die freie Software R (Version 2.8, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)) verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Zur Etablierung der ZBT wurden zunächst Bestrahlungen von Blutproben eines gesunden Spenders *in vitro* durchgeführt und eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erstellt. Die MN/1000 BLZ nahmen hierbei in Abhängigkeit der Dosis nahezu linear zu  $y=0,84 + 13,17x$ ;  $R=0,99341$  (Abbildung 11).

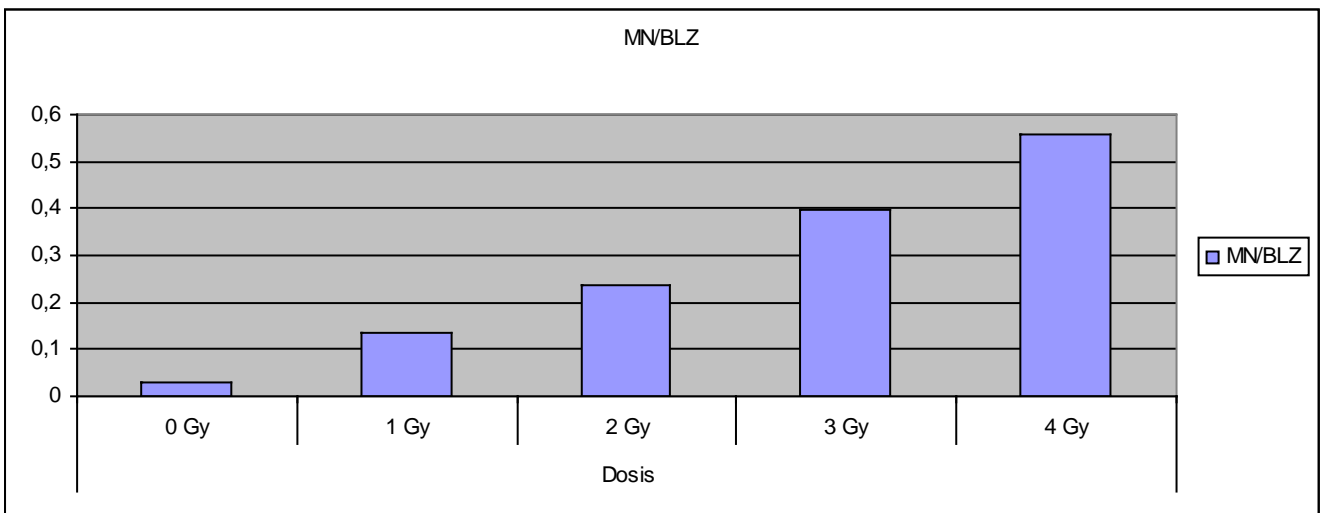


Abbildung 11: Dosis-Wirkungs-Beziehung

Aufgrund der guten Auszählbarkeit und Übersichtlichkeit der Präparate und des deutlichen Bestrahlungseffektes, wurde die 3 Gy Dosis zur *in-vitro*-Bestrahlung des Patientenvollblutes ausgewählt.

#### 3.2 Chromosomale Aberrationen und Mikronuklei

##### 3.2.1 Vergleich der Verlässlichkeit

Von den 24 Patienten konnten bei 17 Patienten die Blutproben so ausreichend stimuliert werden, dass Ergebnisse für alle Zeitpunkte (vor Therapie, nach 21, 6 Gy und nach 50,4 Gy) vorlagen. Bei 7 Patienten waren im Rahmen der CAA entweder zu wenig oder keine

Metaphasen vorhanden, sodass eine Auswertung nicht möglich war. Bei Anwendung der ZBT waren nur bei zwei Patienten die BLZ nicht beurteilbar oder nicht darzustellen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Nicht auswertbare Präparate (mit „x“ markiert).

| Patient | 0 Gy |     | 21,6 Gy |     | 50,4 Gy |     | 3 Gy ex vivo |     |
|---------|------|-----|---------|-----|---------|-----|--------------|-----|
|         | ZBT  | CAA | ZBT     | CAA | ZBT     | CAA | ZBT          | CAA |
| 1       |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 2       |      |     | x       | x   | x       | x   |              |     |
| 3       |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 4       |      |     |         |     |         | x   |              |     |
| 5       |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 6       |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 7       |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 8       |      |     |         | x   |         | x   |              | x   |
| 9       |      | x   |         |     |         |     |              | x   |
| 10      |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 11      |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 12      |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 13      |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 14      |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 15      |      |     |         |     | x       | x   |              |     |
| 16      |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 17      |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 18      |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 19      |      | x   |         |     |         |     |              | x   |
| 20      |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 21      |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 22      |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 23      |      |     |         |     |         |     |              |     |
| 24      |      | x   |         | x   |         | x   |              | x   |

### 3.2.2 Spontanraten

Die Spontanraten dargestellt mit Hilfe der CAA lagen zwischen 0-0,0700 AF/Lymphozyt (LZ) bzw. 0-0,0400 DC/LZ. Bei der ZBT wurden Spontanraten zwischen 0-0,0220 MN/BLZ beobachtet.

Zur Darstellung des zytogenetischen Schadens wurden bei 21,6 Gy und 50,4 Gy die Spontanraten (0 Gy) jeweils subtrahiert, um nur den durch die Therapie/*in-vitro*-RT hinzugefügten Schaden darzustellen.



*Tabelle 11: Spontanraten für Mikronuklei, azentrische Fragmente und dizentrische Chromosomen.  
n.d.: nicht definiert.*

| Patient | MN     | AF     | DC     |
|---------|--------|--------|--------|
| 1       | 0,0110 | 0,0040 | 0,0010 |
| 2       | 0,0170 | 0,0150 | 0      |
| 3       | 0,0060 | 0,0010 | 0      |
| 4       | 0,0070 | 0,0350 | 0,0200 |
| 5       | 0,0120 | 0,0200 | 0,0100 |
| 6       | 0,0100 | 0,0400 | 0,0200 |
| 7       | 0,0220 | 0,0400 | 0,0100 |
| 8       | 0,0190 | 0,0700 | 0      |
| 9       | 0,0170 | n.d.   | n.d.   |
| 10      | 0,0120 | 0,0300 | 0,0300 |
| 11      | 0,0100 | 0,0200 | 0,0100 |
| 12      | 0,0120 | 0,0400 | 0,0001 |
| 13      | 0,0140 | 0,0200 | 0,0100 |
| 14      | 0      | 0,0400 | 0,0200 |
| 15      | 0,0120 | 0,0300 | 0,0300 |
| 16      | 0,0120 | 0,0000 | 0,0100 |
| 17      | 0,0200 | 0,1000 | 0,0400 |
| 18      | 0,0180 | 0,0200 | 0,0300 |
| 19      | 0,0120 | 0      | n.d.   |
| 20      | 0,0080 | 0,0200 | 0,0100 |
| 21      | 0,0040 | 0,0300 | 0,0100 |
| 22      | 0,0180 | 0,0300 | 0,0200 |
| 23      | 0,0060 | 0,0300 | 0,0400 |
| 24      | 0,0200 | n.d.   | n.d.   |

### 3.2.3 Zytogenetische Schäden und Radiosensitivität

#### 3.2.3.1 Chromosomenaberrationsanalyse

Bei der CAA zeigte sich eine signifikante dosisabhängige Zunahme des zytogenetischen Schadens in Form von AF und DC ( $p < 0,01$ ) (Tabelle 12). Der Median betrug bei 21,6 Gy 0,12 für AF und DC bei einem individuellen zytogenetischen Schaden von 0,01-0,21 (AF/LZ), bzw. 0,07-0,26 (DC/LZ). Nach Applikation von 50,4 Gy zeigte sich ein Median von 0,19 (0,14-0,43) (AF/LZ) bzw. 0,29 (0,15-0,44) (DC/LZ) (Tabelle 12). Die Ergebnisse sind graphisch dargestellt in Abbildung 12 und Abbildung 13.

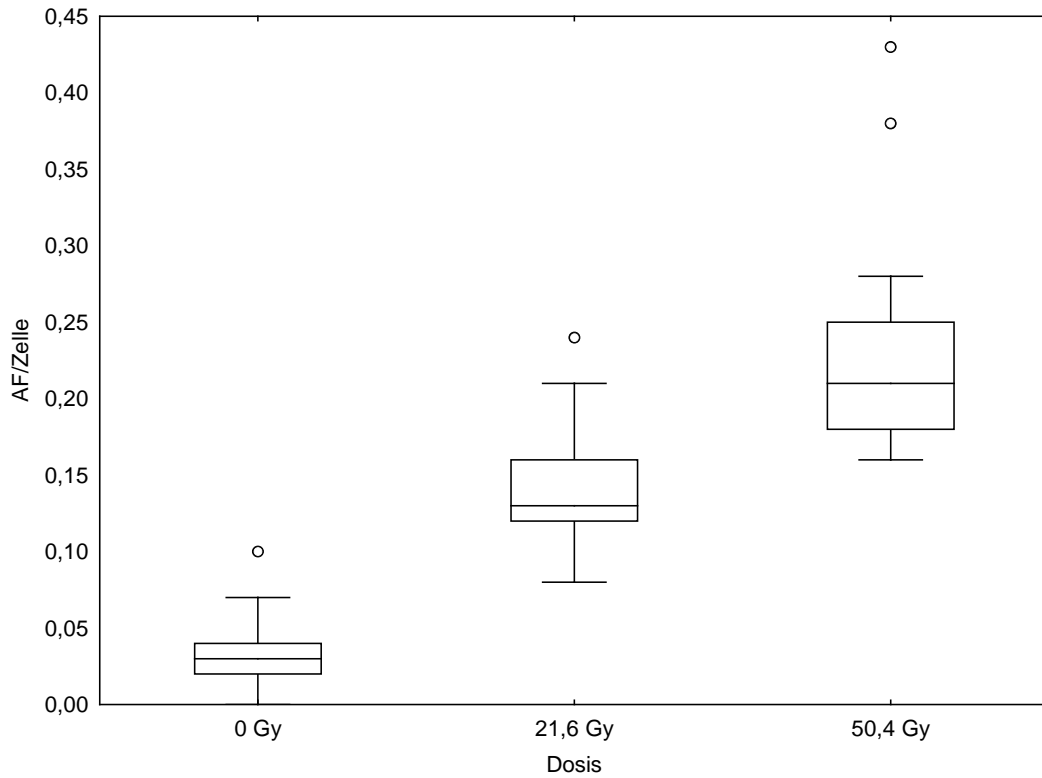


Abbildung 12: Zytogenetischer Schaden in Abhängigkeit von der Dosis (Gy). Die Ausbeuten an acentrischen Fragmenten/Zelle sind als Box-Plots dargestellt.

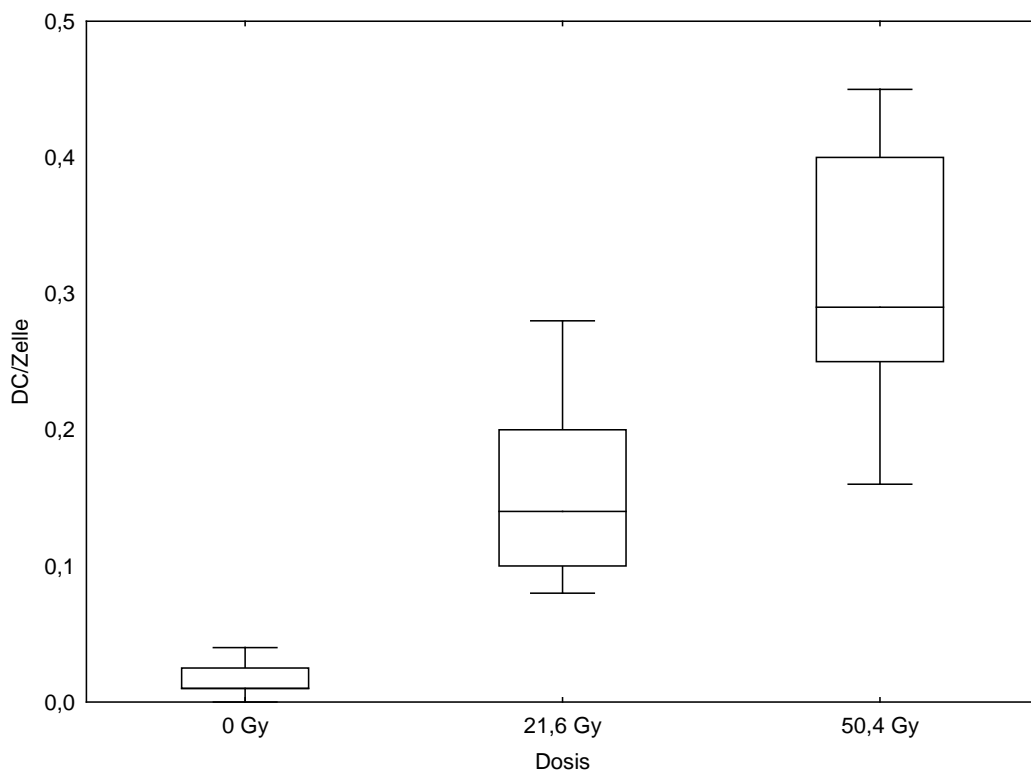


Abbildung 13: Zytogenetischer Schaden in Abhängigkeit von der Dosis (Gy). Die Ausbeuten an dicentrischen Chromosomen/Zelle sind als Box-Plots dargestellt.

### 3.2.3.2 Mikronukleustest

Die in der ZBT ausgezählten MN zeigten eine signifikante dosisabhängige Zunahme ( $p < 0,01$ ) (Tabelle 12). Der Median betrug 0,135 MN/BLZ für 21,6 Gy (0,070-0,229 MN/BLZ) und 0,309 MN/BLZ für 50,4 Gy (0,101-0,490 MN/BLZ). Bei den NPB konnte ein Median von 0,009 (0,003-0,027) bei 21,6 Gy, sowie 0,014 (0-0,033) bei 50,4 Gy gezeigt werden, eine signifikante Zunahme an NPB mit steigender Dosis wurde nicht gefunden (Tabelle 12). Die Ergebnisse sind graphisch dargestellt in Abbildung 14 und Abbildung 15.

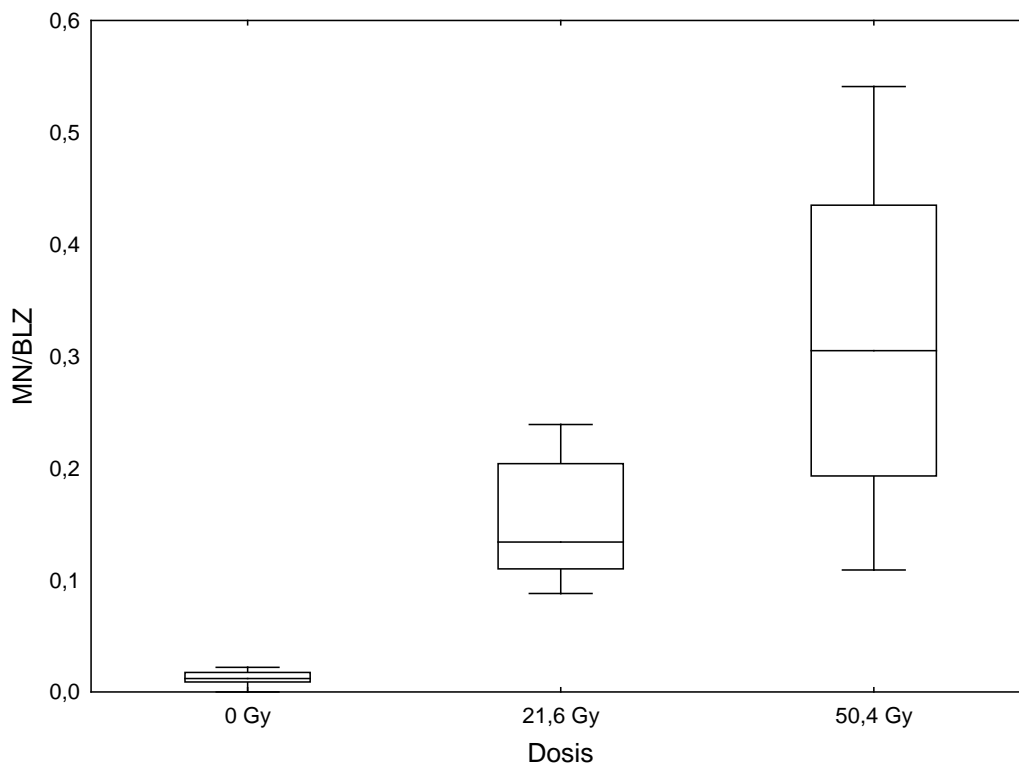


Abbildung 14: Zytogenetischer Schaden in Abhängigkeit von der Dosis (Gy). Die Ausbeuten an Mikronuklei/BLZ sind als Box-Plots dargestellt.

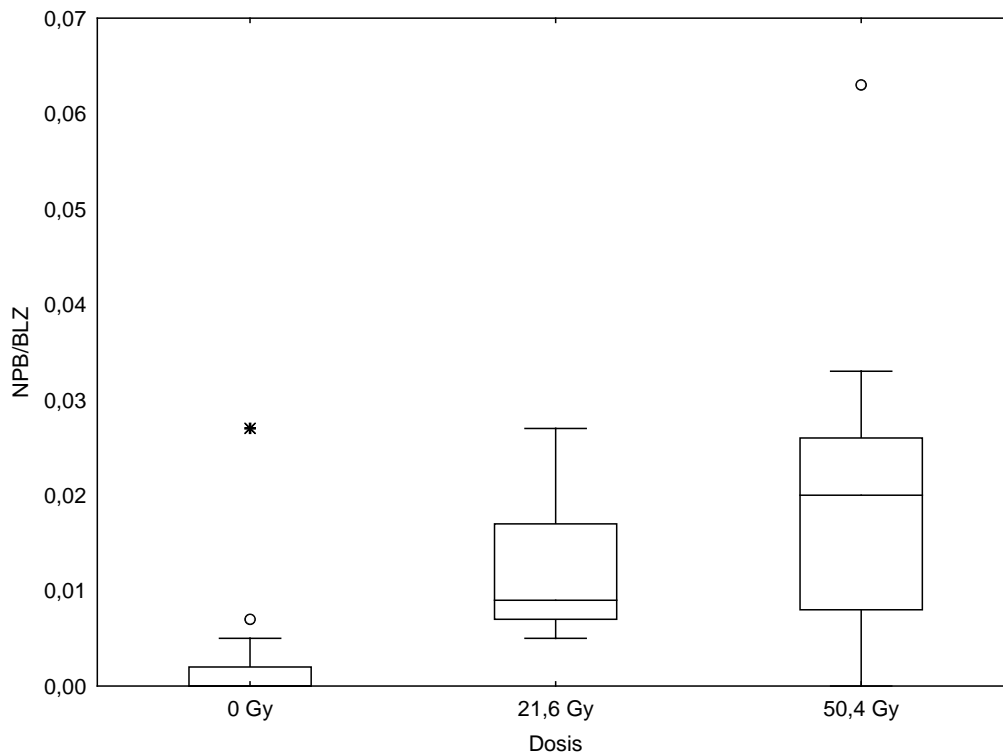


Abbildung 15: Zytogenetischer Schaden in Abhängigkeit von der Dosis (Gy). Die Ausbeuten an NPB/BLZ sind als Box-Plots dargestellt.

Tabelle 12: Vergleich von Chromosomenaberrationen (CA) pro Zelle und Mikronuklei (MN)/Nukleoplasmabrücke (NPB) pro binukleäre Zelle zwischen den Dosispaaren.

| Methode                   | Verglichene Dosen (Gy) | CA und MN |       |       | p      |
|---------------------------|------------------------|-----------|-------|-------|--------|
|                           |                        | Median    | Min   | Max   |        |
| Mikronuklei               | 21,6                   | 0,135     | 0,070 | 0,229 | < 0,01 |
|                           | 50,4                   | 0,309     | 0,101 | 0,490 |        |
| Chromosomen (azentrisch)  | 21,6                   | 0,120     | 0,010 | 0,210 | < 0,01 |
|                           | 50,4                   | 0,190     | 0,140 | 0,430 |        |
| Chromosomen (dizentrisch) | 21,6                   | 0,120     | 0,070 | 0,260 | < 0,01 |
|                           | 50,4                   | 0,290     | 0,150 | 0,440 |        |
| Nukleoplasmabrücken       | 21,6                   | 0,009     | 0,003 | 0,027 | 0,18   |
|                           | 50,4                   | 0,014     | 0,000 | 0,033 |        |

### 3.2.4 Vergleich von CAA und ZBT

Bei direktem Vergleich der beiden Methoden zeigte sich bezüglich des Äquivalenztests nach Westlake eine statistisch signifikante Übereinstimmung für DC und MN bei 21,6 Gy und 50,4 Gy (Tabelle 13, Abbildung 16;  $p < 0,05$ ). Die beiden Methoden sind in Bezug auf MN und DC also als gleichwertig anzusehen. Auch für AF und MN konnte eine statistisch signifikante Übereinstimmung für 21,6 Gy, jedoch nicht für 50,4 Gy gezeigt werden (Tabelle 13, Abbildung 16;  $p = 0,42$ ). Für die NPB konnte kein Dosiseffekt gezeigt werden (Tabelle 13, Abbildung 16).

*Tabelle 13: Vergleich von Chromosomenaberrationen (CA) pro Zelle und Mikronuklei (MN)/Nukleoplasmabrücken (NPB) pro binukleäre Zelle, separat für die unterschiedlichen Dosen (angepasst nach Bonferroni, Signifikanzlevel:  $0.05/3 = 0.0167$ ).*

| Dosis<br>(Gy) | Verglichene Methoden      | CA and MN |       |       | P<br>(Wilcoxon) | p<br>(Westlake) |
|---------------|---------------------------|-----------|-------|-------|-----------------|-----------------|
|               |                           | Median    | Min   | Max   |                 |                 |
| 21,6          | Mikronuklei               | 0,135     | 0,070 | 0,229 | 0,43            | < 0,01          |
|               | Chromosomen (azentrisch)  | 0,120     | 0,010 | 0,210 |                 |                 |
| 50,4          | Mikronuklei               | 0,309     | 0,101 | 0,490 | 0,04            | 0,42            |
|               | Chromosomen (azentrisch)  | 0,190     | 0,140 | 0,430 |                 |                 |
| 21,6          | Mikronuklei               | 0,135     | 0,070 | 0,229 | 0,75            | < 0,01          |
|               | Chromosomen (dizentrisch) | 0,120     | 0,070 | 0,260 |                 |                 |
| 50,4          | Mikronuklei               | 0,309     | 0,101 | 0,490 | 0,78            | < 0,01          |
|               | Chromosomen (dizentrisch) | 0,290     | 0,150 | 0,440 |                 |                 |
| 21,6          | Nukleoplasmabrücken       | 0,009     | 0,003 | 0,027 | < 0,01          | 1,00            |
|               | Chromosomen (dizentrisch) | 0,120     | 0,070 | 0,260 |                 |                 |
| 50,4          | Nukleoplasmabrücken       | 0,014     | 0,000 | 0,033 | < 0,01          | 1,00            |
|               | Chromosomen (dizentrisch) | 0,290     | 0,150 | 0,44  |                 |                 |

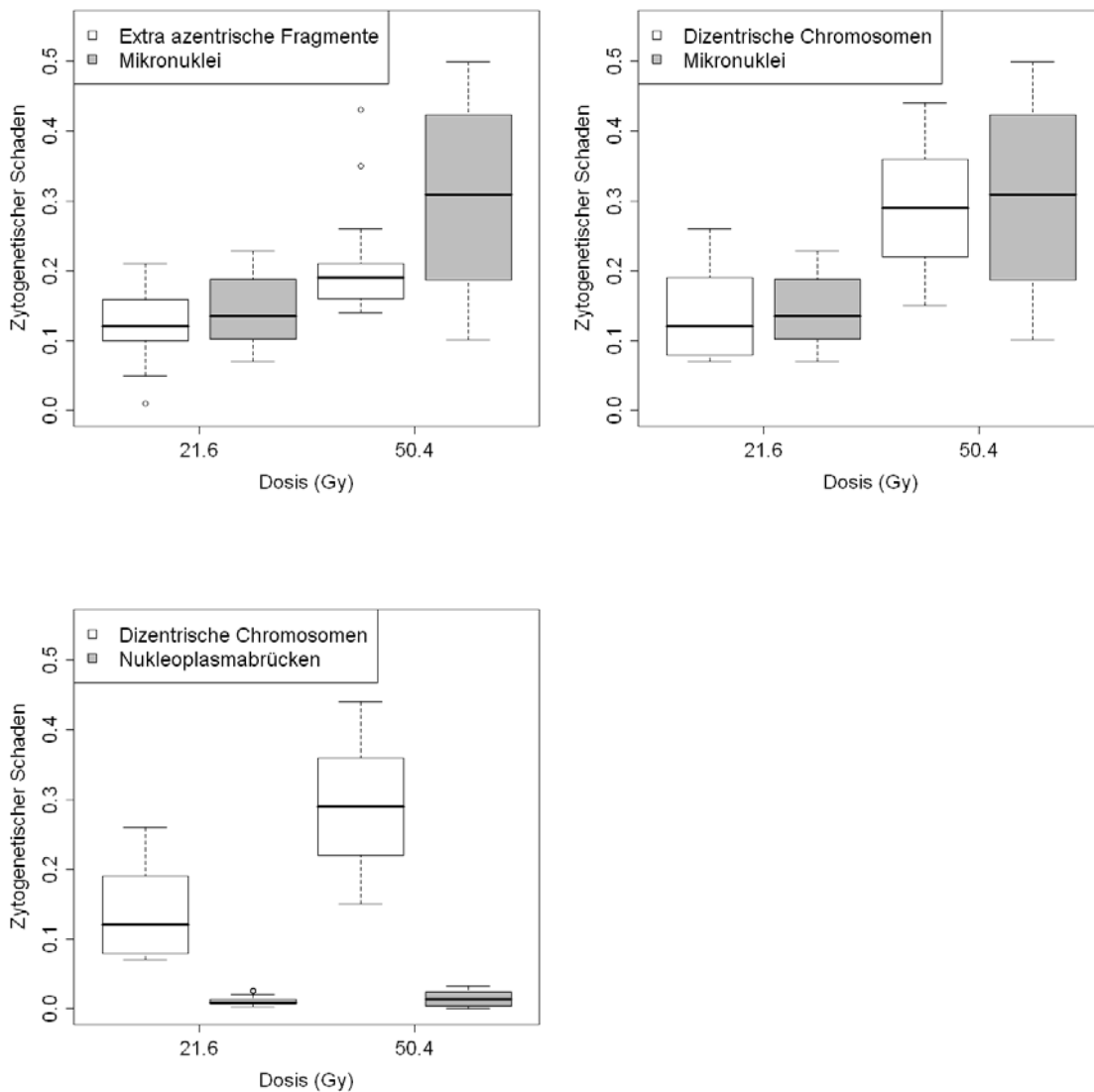


Abbildung 16: Zytogenetischer Schaden in Abhängigkeit von der Dosis (Gy). Vergleich von Mikronuklei/binukleäre Zelle mit azentrischen Chromosomen/Zelle und dizentrischen Chromosomen (DC)/Zelle sowie von Nukleoplasmabrücken/binukleäre Zelle mit DC.

### 3.2.5 3-Gy-*in-vitro*-Bestrahlung

Die 3-Gy-*in-vitro*-Bestrahlung zeigte einen signifikanten Anstieg des zytogenetischen Schadens in Abhängigkeit von der Dosis für MN, DC und AF (Tabelle 14). Für die NPB zeigte sich auch hier kein Dosisseffekt. In Tabelle 14 sind jeweils der Median als auch der Minimal- und der Maximalwert für die zytogenetischen Schäden angegeben.

Tabelle 14: Zunahme des zytogenetischen Schadens durch *in-vitro*-Bestrahlung

| Methoden                 | Dosis (Gy) | Median              | p      |
|--------------------------|------------|---------------------|--------|
| Mikronuklei              | 0          | 0,012 (0-0,022)     | < 0,01 |
|                          | 3          | 0,410 (0,207-0,498) |        |
| Azentrische Fragmente    | 0          | 0,030 (0-0,100)     | < 0,01 |
|                          | 3          | 0,285 (0,180-0,510) |        |
| Dizentrische Chromosomen | 0          | 0,010 (0-0,040)     | < 0,01 |
|                          | 3          | 0,330 (0,230-0,470) |        |
| Nukleoplasmabrücken      | 0          | 0 (0-0,0070)        | 0,32   |
|                          | 3          | 0,0002 (0-0,0005)   |        |

### 3.2.6 NDI

Zur Berechnung des NDI ist es notwendig alle ein- bis vierkernigen Lymphozyten beim Durchzählen einer Probe zu registrieren. In Tabelle 15 sind die NDI sowohl im Verlauf der RCT als auch nach *in-vitro*-RT dargestellt. Im Mittel zeigte sich bei allen Patienten während der *in-vivo*-RCT ein Anstieg des NDI von 1,79 (1,41-2,51) bei 0 Gy bis 1,80 (1,23-2,88) bei 21,6 Gy und 1,87 (1,47-2,43) bei 50,4 Gy. Während der *in-vitro*-RT kam es zu einem mittleren Abfall auf 1,52 (1,13-1,99).

Tabelle 15: NDI im Verlaufe der *in-vivo*-RCT, sowie nach *in-vitro*-RT.

| Patient | NDI  |         |         |      |
|---------|------|---------|---------|------|
|         | 0 Gy | 21,6 Gy | 50,4 Gy | 3 Gy |
| 1       | 1,45 | 1,27    | 1,53    | 1,27 |
| 2       | 1,58 | 2,00    | 2,00    | 1,60 |
| 3       | 2,04 | 1,62    | 2,40    | 1,84 |
| 4       | 1,55 | 1,76    | 1,48    | 1,50 |
| 5       | 1,82 | 2,16    | 1,82    | 1,54 |
| 6       | 1,41 | 1,23    | 1,86    | 1,34 |
| 7       | 1,77 | 1,53    | 1,86    | 1,47 |
| 8       | 1,87 | 2,88    | 2,07    | 1,50 |
| 9       | 1,87 | 1,45    | 2,27    | 1,32 |
| 10      | 1,44 | 1,96    | 2,43    | 1,44 |
| 11      | 1,82 | 1,75    | 1,79    | 1,54 |
| 12      | 1,94 | 1,91    | 1,67    | 1,40 |
| 13      | 1,80 | 1,84    | 1,71    | 1,56 |
| 14      | 2,51 | 1,43    | 1,50    | 1,72 |
| 15      | 2,08 | 2,05    | 2,00    | 1,98 |

|    |      |      |      |      |
|----|------|------|------|------|
| 16 | 2,14 | 1,87 | 1,90 | 1,75 |
| 17 | 1,64 | 1,58 | 1,47 | 1,13 |
| 18 | 1,73 | 1,77 | 1,88 | 1,63 |
| 19 | 1,91 | 1,75 | 1,82 | 1,37 |
| 20 | 1,52 | 1,66 | 1,73 | 1,47 |
| 21 | 1,82 | 1,94 | 1,89 | 1,42 |
| 22 | 1,58 | 1,96 | 1,94 | 1,54 |
| 23 | 1,83 | 1,97 | 2,03 | 1,64 |
| 24 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |

### 3.2.7 Wirkung der Chemotherapie auf den zytogenetischen Schaden im Blut

Der zytogenetische Schaden, der *in vitro* durch 5-FU und Oxaliplatin in den PBL der gesunden Spender (n=4) verursacht wurde, ist in Tabelle 16 dargestellt. Es zeigte sich ein leichter Anstieg der MN nach Zugabe von 5-FU (0,0065; 0,0025) und Oxaliplatin (0,0115; 0,0130), der allerdings - auch in Abhängigkeit der Einwirkzeit - nicht statistisch signifikant war ( $p > 0,05$ ).

*Tabelle 16: Zytogenetischer Schaden in Form von Mikronuklei (MN) pro binukleäre Zelle (BLZ) (n=4) nach Zugabe von Fluorouracil (5-FU), Oxaliplatin und ohne Chemotherapeutikum in Abhängigkeit von der Wirkungszeit.*

| CTX                    | Median MN/BLZ | p    |
|------------------------|---------------|------|
| 1h ohne CTX            | 0,0025        | 0,71 |
| 24h ohne CTX           | 0,0020        |      |
| 1h 5-FU 0.15 µg/ml     | 0,0065        | 0,18 |
| 24h 5-FU 0.15 µg/ml    | 0,0025        |      |
| 2h Oxaliplatin 2.5 µM  | 0,0115        | 1,00 |
| 25h Oxaliplatin 2.5 µM | 0,0130        |      |



Der Vergleich der zytogenetischen Schäden von Arm-A- und Arm-B-Patienten wird in Tabelle 17 dargestellt. Es zeigte sich für AF, DC, MN und NPB für Arm-B-Patienten jeweils eine geringere Zunahme des Schadens im Median, jedoch war dieser nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ). Dieses Ergebnis ist graphisch in Abbildung 17 dargestellt.

Tabelle 17: Vergleich des zytogenetischen Schadens in Form von Chromosomenaberrationen pro Zelle und Mikronuklei (MN)/Nukleoplasmabrücken (NPB) pro binukleäre Zelle zwischen Arm-A- und Arm-B-Patienten bei 50,4 Gy.

| Form des zytogenetischen Schadens | Therapiearm | Zytogenetischer Schaden |       |       | p    |
|-----------------------------------|-------------|-------------------------|-------|-------|------|
|                                   |             | Median                  | Min   | Max   |      |
| Azentrische Fragmente             | A           | 0,210                   | 0,140 | 0,430 | 0,22 |
|                                   | B           | 0,180                   | 0,160 | 0,190 |      |
| Dizentrische Chromosomen          | A           | 0,340                   | 0,150 | 0,440 | 0,43 |
|                                   | B           | 0,250                   | 0,220 | 0,400 |      |
| Mikronuklei                       | A           | 0,377                   | 0,134 | 0,534 | 0,10 |
|                                   | B           | 0,213                   | 0,098 | 0,484 |      |
| Nukleoplasmabrücken               | A           | 0,021                   | 0,002 | 0,036 | 0,45 |
|                                   | B           | 0,013                   | 0     | 0,033 |      |

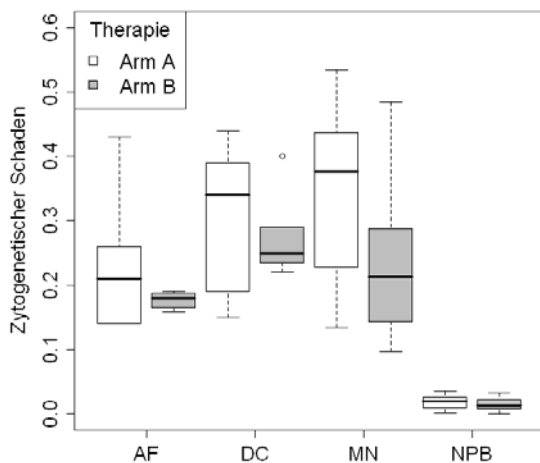


Abbildung 17: Zytogenetischer Schaden in Form von Chromosomenaberrationen pro Zelle und Mikronuklei (MN)/Nukleoplasmabrücken (NPB) pro binukleäre Zelle zwischen Arm-A- und Arm-B-Patienten bei 50,4 Gy.

### 3.2.8 Leukozyten und Lymphozyten

Die Leukozyten beinhalten das gesamte Spektrum der „weißen“ Blutzellen inklusive Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten u.a. Der Normwert der Leukozyten befindet sich zwischen  $4,0-11,0 \times 10^3/\mu\text{l}$  und lag zu Beginn der RCT (0 Gy) bei allen Patienten in diesem Bereich. Während der RT kam es nach 21,6 Gy bei 22 Patienten zu einem Abfall der Leukozyten, bei 6 Patienten sank der Wert unter die Norm von  $4,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Im weiteren Verlauf der RCT wurde nur bei einem Patienten kein Abfall des Wertes im Vergleich zum Beginn der Behandlung beobachtet, bei 6 Patienten lag der Wert unter der Norm (Tabelle 18). Die radiosensiblen B-Lymphozyten, welche anteilig an Leukozyten in % angegeben werden, wurden nur bei 4 Patienten nicht komplett bestimmt (Tabelle 18) und lagen bei 0 Gy bei 22,7% der Patienten außerhalb des Normbereiches von 20-45%. Bei 100% der Patienten zeigte sich ein Abfall der B-Lymphozyten nach 21,6 Gy und 50,4 Gy. 66,67% der Lymphozyten-Werte lagen nach 21,6 Gy unter der Norm, nach 50,4 Gy waren es 100%.

Tabelle 18: Leukozyten- und Lymphozytenwerte im Verlauf der Bestrahlung

| Patient | Leukozyten ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) |         |         | B-Lymphozyten (%) |      |        |
|---------|--|---------|---------|-------------------|------|--------|
|         | 0 Gy                                     | 21,6 Gy | 50,4 Gy | 0 Gy              | 21,6 | 50,4Gy |
| 1       | 5,8                                      | 3,2     | 6,6     | 39,1              | 27,3 | 9,5    |
| 2       | 5,8                                      | 7,6     | 4,4     | 17,1              | 1    | 4,1    |
| 3       | 7,5                                      | 5,9     | 6,6     | 22,6              | 14   | 7,3    |
| 4       | 6,2                                      | 6,1     | 3,6     | 18,3              | 12,9 | 7,7    |
| 5       | 5  | 2,3     | n.a.    | 24                | n.a. | n.a.   |
| 6       | 6,4                                      | 4,2     | 6,1     | 23,1              | n.a. | n.a.   |
| 7       | 6,6                                      | 4,5     | 4,5     | 39,6              | 21,7 | 16     |
| 8       | 6,6                                      | 2,6     | 5,2     | 23                | 20,7 | 9,5    |
| 9       | 10                                       | 5,4     | 7,3     | n.a.              | n.a. | 5      |
| 10      | 6,8                                      | 5,4     | 5,8     | 16                | 17,1 | 5,8    |
| 11      | 6,6                                      | 4       | 5,4     | 26,1              | 18,6 | 7,1    |
| 12      | 4,7                                      | 6,8     | 3,6     | 36,5              | 15,1 | 11,6   |
| 13      | 5,5                                      | 3,3     | 2,6     | 28,1              | 17,9 | 14,4   |
| 14      | 5,8                                      | 4,4     | 3,8     | n.a.              | n.a. | n.a.   |
| 15      | 6,5                                      | 5       | 2,8     | 20,1              | 18,5 | 12,4   |
| 16      | 5,2                                      | 3,2     | 4,5     | 24,3              | 16,8 | 5,5    |
| 17      | 10,7                                     | 4,6     | 5,5     | 20,4              | 17,1 | 7,4    |
| 18      | 9,7                                      | 6,4     | 5,2     | 27,5              | 18,6 | 12,5   |
| 19      | 6,9                                      | 4,8     | 3,9     | 19,8              | 13,7 | 14,6   |
| 20      | 7,7                                      | 7,2     | 6,4     | 22,1              | 18,9 | 19,8   |
| 21      | 5,6                                      | 5,5     | 4,9     | 39,2              | 29,8 | 13,9   |
| 22      | 8,1                                      | 6,5     | 5,2     | 19,5              | 14,4 | 10,9   |
| 23      | 5,7                                      | 3,7     | 4,5     | 31,4              | 24,8 | 16,4   |
| 24      | 8,2                                      | 5,7     | 4,5     | 39                | 32,4 | 14     |

## 4 Diskussion

### 4.1 Äquivalenz von Chromosomenaberrationsanalyse und Mikronukleustest

Seit den sechziger Jahren versucht man die Dosis von strahlenexponierten Personen anhand von biologischen Veränderungen in peripheren Blutlymphozyten (PBL) abzuschätzen (Gooch et al. 1964, Bender und Gooch 1967, Muller and Streffer 1991, Wolff S 1991). Hierbei wird mit Hilfe von durch *in-vitro*-Experimente gewonnenen Eichkurven ein Zusammenhang zwischen der Strahlendosis und der Anzahl an Mikronuklei (Fenech and Morley 1985, Fenech and Morley 1986, Mitchell and Norman 1987, Prosser et al. 1988), der Apoptoserate (Menz et al. 1997, Abend et al. 2000) oder der Quantität an Chromosomenaberrationen pro Zelle (Lloyd et al. 1975, Edwards et al. 1979, Pantelias and Maillie 1984, Finnon et al. 1995, Prasanna et al. 2000) hergestellt.

Zytogenetische Techniken wie die weit verbreitete CAA (Matsubara et al. 1974, Antoine et al. 1981, Obe et al. 1981, Diener et al. 1988, Pathak et al. 2007, Seoane et al. 2007, Stephan et al. 2007, Fernandes et al. 2008, Xuncla et al. 2008) oder die heutzutage immer häufiger benutzte ZBT (Lee et al. 2000, Thomas et al. 2003, Widel et al. 2003, Padjas et al. 2005, Singh et al. 2005, Bahl et al. 2006, Mateuca et al. 2006, Fenech 2007, Pathak et al. 2007, Seoane et al. 2007, Gamulin et al. 2008, Slonina et al. 2008) sind zuverlässige Indikatoren für die Erkennung von Genomschäden *in vivo* und *in vitro*.

Die Chromosomenaberrationstechnik wird zur Identifizierung von stabilen und instabilen Aberrationen genutzt. Eine dosisabhängige Zunahme von DC unter Radiotherapie ist bekannt (Matsubara et al. 1974, Antoine et al. 1981, Obe et al. 1981, Diener et al. 1988). Die Methode ist sehr sensitiv zur Dokumentation absorbiertes Strahlendosis und kann die Formen der chromosomalen Schädigungen wie AF oder DC differenzieren, gleichzeitig ist sie jedoch auch sehr aufwendig in der Durchführung, sodass ein genaues statistisches Ergebnis mit viel Zeitaufwand verbunden ist und eine gut geschulte Arbeitskraft erfordert.

Der Mikronukleustest basiert auf einer einfacheren zytogenetischen Technik (Countryman and Heddle 1976) und ist dabei mindestens ebenso zuverlässig und sensitiv (Kormos and Koteles 1988). Die Auswertung mit der ZBT (Fenech 2000) erlaubt die Analyse der chromosomalen Schäden nach einmaliger Zellteilung. Bei der CAA kann dies nur erreicht werden durch Aufarbeitung mit Bromodeoxyuridin (BRDU) und einer speziellen Färbetechnik.

In dieser Arbeit wurden die CAA und der MNT erstmals bezüglich ihrer Äquivalenz im Rahmen einer großen prospektiven klinischen Phase III Studie geprüft. Anhand der CAA und der ZBT konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die neoadjuvante RCT in der DNA der Lymphozyten der Patienten einen zytogenetischen Schaden anrichtet, der bei beiden Techniken im Verlauf der Therapie signifikant zunahm.

Eine statistisch signifikante Äquivalenz beider Methoden zwischen DC und MN wurde bei 21,6 Gy und 50,4 Gy beobachtet (Westlake 1981). AF und MN zeigten lediglich bei 21,6 Gy eine statistisch signifikante Übereinstimmung, bei 50,4 Gy wurde bei AF und MN eine weitere Zunahme des zytogenetischen Schadens beobachtet, jedoch keine statistisch signifikante Äquivalenz auf Grund der geringer zunehmenden AF. Theoretisch entsteht ein strahleninduzierter MN durch Bildung eines AF (Countryman and Heddle 1976, Heddle and Carrano 1977, Degrassi and Tanzarella 1988, Thomson and Perry 1988, Fenech 2007), diesbezüglich wurden entsprechende Dosis-Wirkungs-Kurven gezeigt für MN, AF und acentrische Ringe, wobei AF meist zu MN und DC zu NPB konvertierten. Dies ist jedoch nicht immer der Fall (Littlefield et al. 1989, Thomas et al. 2003). Die Daten dieser Arbeit korrelieren mit den Ergebnissen von Littlefield, der bei hohen Dosen ein Missverhältnis zwischen AF und MN beobachtet hat (0-4 Gy *in vitro*) (Littlefield et al. 1989). Bei Littlefield waren jedoch die AF stärker erhöht als die MN, in dieser Arbeit zeigten die MN einen stärkeren Anstieg. Eine Ursache für das von Littlefield beobachtete Missverhältnis könnte darin gesehen werden, dass MN nicht nur einen einzigen sondern multiple AF und vor allem andere chromosomale Strukturen repräsentieren. Alternativ könnte auch der Einschluss von MN in einen der beiden Zellkerne mit höherer Bestrahlungsdosis zunehmen (Savage 1988). Savage behauptete, dass die Frequenz der MN eine Funktion der Wahrscheinlichkeit ist, mit der AF im Zellkern während der postmitotischen Zellreformation eingeschlossen werden (Savage 1988). Die Wiederaufnahme von beschädigten Chromosomen oder Fragmenten in den Zellkern wurde auch von Minissi et al. beschrieben (Minissi et al. 1999). Eine weitere Erklärung könnte sein, dass MN bei der Aufbringung auf den OT hinter dem Zellkern versteckt sind. Insgesamt bleibt jedoch festzuhalten, dass im Rahmen dieser Arbeit sowohl für die AF als auch die MN auch bei 50,4 Gy jeweils ein dosisabhängiger Anstieg verzeichnet werden konnte, der im Gegensatz zum Vergleich der AF mit den MN bei 21,6 Gy sowie den DC und den MN bei 21,6 Gy und 50,4 Gy lediglich nicht quantitativ äquivalent ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit spiegeln sich auch in anderen Arbeiten wieder, in denen ebenfalls eine Zunahme der Frequenz von DC, MN (Fenech et al. 1990, Gantenberg et al.

1991) oder DC und MN durch RT beschrieben worden ist (Garaj-Vrhovac et al. 1992, Thierens et al. 1995, Catena et al. 1996, Hatayoglu and Orta 2007, Gamulin et al. 2008). Gamulin et al. untersuchten Oropharynx-CA-Patienten vor, während und nach RT. Es wurden sowohl strukturelle CA (AF, DC) als auch Schwesterchromatidaustausche untersucht. 100 Metaphasen pro Probe wurden analysiert bezüglich Anzahl und Art der CA und der Anteil aberranter Zellen wurde angegeben. Die Autoren beschrieben eine Korrelation zwischen den Resultaten der ZBT und der CAA.

In einer Arbeit von Garaj-Vrhovac et al. wurden PBL von gesunden Spendern mit unterschiedlichen Dosen und variabler Bestrahlungszeit *in vitro* bestrahlt. Es wurden Chromatidbrüche, Chromosomenbrüche, AF, DC und zentrische Ringe ausgezählt. Eine positive Korrelation zwischen MN und CA (AF, DC) konnte gezeigt werden (Garaj-Vrhovac et al. 1992).

Hatayoglu und Orta prüften das Verhältnis zwischen ZBT und CAA bei *in vitro* bestrahlten PBL von drei gesunden Spendern bei unterschiedlichen Dosen (1 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy). Es wurden AF, DC, trizentrische Chromosomen und zentrische Ringe evaluiert. Die Ergebnisse zeigten ein signifikantes Verhältnis zwischen MN und DC nach Bestrahlung der gesunden PBL ( $p > 0.05$ ) (Hatayoglu and Orta 2007). Kormos und Koteles verglichen das Dosis-Wirkungs-Verhältnis von DC und AF mit MN in kultivierten humanen PBL nach ionisierender Bestrahlung. Die Resultate zeigten eine vergleichbare Sensitivität bei der Bildung von MN und DC.

Es ist in *in-vitro*-Experimenten beschrieben worden, dass DC und AF in der ZBT NPB und MN entsprechen (Fenech 2007). NPB-Bildung zwischen zwei Zellkernen in BLZ wurde auch von anderen Autoren beschrieben und eine positive Korrelation zwischen NPB und MN konnte gezeigt werden (Umegaki and Fenech 2000, Crott et al. 2001). Diese Untersuchungen wurden durchgeführt *in vitro* unter oxidativem Stress und unter Folatmangel. Zwei mögliche Erklärungen für die Ausbildung von NPB aus DC sind eine falsche Reparatur von DNA – Strangbrüchen oder Fusion von Telomerenden, dennoch ist die Entstehung nicht endgültig geklärt (Fenech 2007). Nicht alle DC und dizentrischen Ringe erscheinen als NPB, da DC auch zu einem einzigen Zellpol wandern können und sich dann keine NPB ausbildet. Ringchromosomen müssen mindestens einen Schwesterchromatidwechsel vor der Mitose durchgeführt haben, um ein dizentrisches Ringchromosom oder einen verknüpften Doppelring zu bilden. Dies ist eine Voraussetzung zur Bildung einer NPB, unter der Bedingung, dass die

Zentromere zum gleichen Zellpol wandern (Thomas et al. 2003). Die in dieser Arbeit erzielten *in-vivo*-Ergebnisse bezüglich der NPB zeigten keinen signifikanten dosisabhängigen Anstieg.

#### **4.2 Einfluss der CTX auf den gemessenen zytogenetischen Schaden**

Es wurde bereits in anderen Arbeiten gezeigt, dass Oxaliplatin als auch 5-FU zytogenetische Schäden induzieren (Parker and Cheng 1990, Woynarowski et al. 2000, Almeida et al. 2006, Hoskins and Scott Butler 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies bestätigt werden, jedoch war der gemessene Anstieg der MN-Frequenz statistisch nicht signifikant. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit anderen Arbeiten: Sala-Trepat et al. untersuchten MC Patientinnen, die entweder zunächst mit RTX und anschließend mit CTX behandelt wurden oder andersherum. Ein Zyklus CTX bestand aus einer Gabe von 5-FU, Adriamycin und Cyclophosphamid. Der Effekt der CTX und RTX, allein oder in Kombination, zeigte keinen Effekt der CTX auf den zytogenetischen Schaden, sodass dieser allein auf die RTX zurückzuführen war (Sala-Trepat et al. 1990). Rigaud et al. beobachteten instabile CA in PBL von MC Patientinnen, die eine RTX, eine CTX (5-FU, Adriamycin und Cyclophosphamid) oder beides erhielten. Die RTX verursachte instabile CA wie DC oder AF, CTX alleine induzierte keine derartigen Aberrationen (Rigaud et al. 1990). Ähnliche Resultate wurden durch Bilban-Jakopin und Bilban erzielt, die ein Kollektiv von 30 Patienten mit Morbus Hodgkin rekrutierten. Gruppe I erhielt CTX in Form von MOPP/ABV (Mechlorethamin, Vincristin, Procarbazin, Prednison/Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastin), Gruppe II erhielt CTX plus RTX, Gruppe III war ein Kontrollgruppe ohne maligne Erkrankung oder Therapie. In Gruppe I und II wurde ein signifikanter Anstieg von CA (Chromosomenbrüche, DC, AF, Ringchromosomen), MN und Schwesterchromatidaustausch beobachtet. Statistisch signifikante Unterschiede, bezogen auf MN ( $p < 0,005$ ) und CA ( $p < 0,005$ ), wurden zwischen Gruppe I und II gefunden. Es wurde eine signifikant größere Zunahme von CA und MN für Patienten, die mit CTX und RTX, als nur mit CTX behandelt wurden (Bilban-Jakopin and Bilban 2001), festgestellt. Gegenteilige Ergebnisse bezogen auf das Verhältnis des zytogenetischen Schadens verursacht durch RTX und CTX sind in der Literatur nicht beschrieben.

### 4.3 Zytogenetischer Schaden in Therapiearm A und B im Vergleich

Vergleicht man beide Therapiearme der vorliegenden Arbeit, so wurde ein geringerer zytogenetischer Schaden für Arm-B-Patienten (5-FU plus Oxaliplatin) als für Arm-A-Patienten (5-FU) dokumentiert, dieser war jedoch statistisch nicht signifikant. Die Ergebnisse zeigen eine größere Variabilität des Schadens bei Arm-A-Patienten. Wie oben beschrieben hat die Chemotherapie keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Zunahme des DNA-Schadens in den Lymphozyten, sodass vermutlich die individuelle Radiosensitivität eines jeden Patienten die Ursache dafür ist (Fertil and Malaise 1985, Gantenberg et al. 1991, Thierens et al. 1991, Vral et al. 1997).

### 4.4 Lymphozyten zur Detektion zytogenetischer Schäden

Bei Experimentbeginn befinden sich, mit Ausnahme einer geringen Anzahl durch Antigene stimulierter Lymphozyten, die PBL in der G<sub>0</sub>-Phase. Da die Strahlenempfindlichkeit von dem Zellzyklusstadium abhängt (Gillespie et al. 1975, Bedford et al. 1978, Geard 1985, Zaider 1996), ist diese Homogenität von Vorteil für die strahlenbiologischen Experimente. Einen weiteren Vorteil bietet die einfache Entnahme der Zellen, die durch unkomplizierte Verfahren aus den Blutproben isoliert werden können.

Die Variabilität des individuellen Ansprechens auf RT wird durch unterschiedliche biologische Elemente verursacht: Anteil an Zelluntergang in den bestrahlten Zellen; unterschiedliche Mengen zwischen PBL Subpopulationen; die Anzahl an Zellen, die nach RT rezirkulieren; der Effekt der Vermischung mit nicht bestrahlten PBL. Die Wirkung dieser und anderer nicht so gewichtigen Elemente bestimmen den Grad des zytogenetischen Effektes (Catena et al. 1996).

Eine Abnahme der Lymphozytenzahl im Blut durch Einwirken ionisierender Strahlung ist bereits beschrieben worden (Dutreix et al. 1987) und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Betrachtet man den NDI, welcher die Vitalität einer Zellkultur bezogen auf seine Teilungsfähigkeit dokumentiert, so ist unter *in-vitro*-Bedingungen eine Abnahme beobachtet worden, wie schon durch Eastmond und Tucker (Eastmond and Tucker 1989) beschrieben. Eastmond und Tucker bestrahlten das Vollblut eines gesunden Spenders mit 1-4 Gy Dosis und wendeten anschließend den Mikronukleustest nach dem Protokoll von Fenech (Fenech 1985) an. Eine Abnahme des NDI von 1,52 auf 1,47 (1 Gy), 1,39 (2 Gy), 1,40 (3 Gy), 1,28 (4

Gy) konnte beobachtet werden (Eastmond and Tucker 1989). Nicht untersucht wurde in der Arbeit von Eastmond und Tucker die Entwicklung des NDI unter *in-vivo*-Bedingungen. In dieser Arbeit wurde im Mittel eine Zunahme des NDI während der *in-vivo*-RCT beobachtet.

#### **4.5 Prädiktion strahlentherapeutischer Effekte auf Tumor- und Normalgewebe durch Messung des zytogenetischen Schadens**

Die intrinsische Radiosensitivität ist eine wichtige und unabhängige Determinante für Tumoransprechen auf eine RT (Fertil and Malaise 1985). Die Individualisierung einer RT für Krebs basierend auf prädiktiven Untersuchungen der Tumor- und Normalgewebe (Fibroblasten, PBL etc.) - Radiosensitivität (RS) kann die Behandlungsergebnisse einzelner Patienten verbessern. Vor Beginn der RT wäre es sinnvoll zu wissen, wie gesundes Gewebe eines Patienten auf die RT reagieren wird, um Patienten mit hohem Nebenwirkungsrisiko oder Patienten mit Radioresistenz, die auch höhere Dosen ohne ernsthafte Komplikationen tolerieren würden, vorab zu identifizieren (Widel et al. 2003).

Als Grundlage für die Entscheidung zwischen allen verfügbaren Therapiealternativen dient vor allem bei einer multimodalen Therapie nicht zuletzt das Spektrum der zu erwartenden Therapiespätfolgen. Da die Therapiespätfolgen einer perkutanen oder interstitiellen Radiotherapie bisher nicht vorhersagbar sind, könnte die Möglichkeit der Prädiktion einer erhöhten individuellen Strahlenempfindlichkeit im Individualfall die Therapieentscheidung wesentlich erleichtern.

Bei nahezu allen Tumorentitäten treten die Nebenwirkungen der Strahlentherapie in zwei Phasen auf; während die Akutreaktionen behandelbar sind und oft noch im Verlauf der Strahlentherapie wieder abklingen, verläuft die Entwicklung der späten Normalgewebsreaktionen über Jahre oder Jahrzehnte progredient und kann gar nicht oder nur in einem geringen Umfang medikamentös beeinflusst werden. Der Zeitpunkt des Auftretens und der Schweregrad der späten radiogenen Schäden zeigt eine erhebliche Variation (Tucker et al. 1992, Bentzen et al. 1993, Bentzen 1997).

Widel et al. (Widel et al. 1999) untersuchten den prognostischen Wert der Zunahme der MN-Frequenz bei Zervix-Karzinomen (ZC) während der RT *in vivo* in Bezug auf Radiokurabilität. Die Radiosensitivität der *in vitro* kultivierten Zellen, die vor der RT aus Tumorbiopsien gewonnen wurden, wurde mit der ZBT gemessen. Die MN-Frequenz wurde nach Applikation von 2 Gy Dosis gemessen und verglichen mit dem Auftreten von MN in den Tumorzellen



nach 20 Gy *in-vivo*-RT (perkutan). Dabei wurde eine geringe Korrelation zwischen der *in-vitro*- und *in-vivo*-MN-Frequenz festgestellt ( $r=0,324$ ). Es wird suggeriert, dass die MN-Frequenz nach *in-vitro*-RT nicht der RS der gesamten kultivierten Zellpopulation, sondern nur dem Anteil der Zellen entspricht, die die Mitose erreichen. Die Zellen mit der höchsten RS haben vermutlich die Mitose während der Inkubationszeit nicht erreicht oder sie wurden tödlich beschädigt und sind durch Apoptose abgestorben, bevor die MN ausgezählt werden konnten (Scott et al. 1996, Johansen et al. 1998). Obwohl es eine große Streubreite der MN-Frequenz nach *in-vitro*-RT gab (MN/BLZ 0,080-0,416), konnte keine signifikante Korrelation mit den klinischen Ergebnissen festgestellt werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass bei nach 20 Gy *in vivo* bestrahlten Zervixkarzinom eine Zunahme der MN-Frequenz um wenigstens 117,5% im Vergleich zur untersuchten Probe vor Beginn der RT mit einer besseren lokalen Tumorkontrolle ( $p<0,008$ ) und einem besseren Gesamtüberleben ( $p<0,045$ ) einherging. Bei der Analyse der Todesursache fiel auf, dass in der Gruppe der Patienten, die nach 20 Gy *in-vivo*-RT einen MN-Anstieg  $< 163,5\%$  (Mittelwert) des Ausgangswertes zeigten, zu 87% aufgrund lokaler Rezidive und zu 13% an Metastasen verstarben. In der Gruppe, die nach 20 Gy eine Zunahme der MN von  $> 163,5\%$  zum Ausgangswert zeigten, verstarben 40% durch lokale Rezidive und 60% durch Metastasen und/oder generellen Gesundheitskomplikationen. Diese Ergebnisse wurden nach einem 5-Jahres-Follow-up von Widel et al. (Widel et al. 2001) bestätigt und es wurde ergänzt, dass eine hohe Spontanrate an MN vor Beginn der RT ( $\geq 3,8\text{MN}/100\text{BLZ}$ ) ein negativ prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben und die lokale Kontrolle war. Widel et al. (Widel et al. 1999) beschrieben außerdem, dass eine hohe MN Frequenz während der Therapie einhergeht mit vermehrtem Zelltod und dadurch mit besserem Tumoransprechen. Die Schlussfolgerung der Arbeit war, dass eine geringe Zunahme der MN-Frequenz nach 20 Gy bedeutet, dass der Tumor nicht durch RT alleine ansprechen wird und somit weitere adjuvante Behandlungen, z.B. CTX bei diesen Patienten in Betracht gezogen werden sollten. Auf diese Weise könnte eine Zunahme der MN Frequenz *in vivo* eine prädiktive Aussage über die individuelle RS erlauben und bei der Individualisierung einer Behandlungsstrategie helfen (Widel et al. 1999).

Shibamoto et al. (Shibamoto et al. 1994, Shibamoto et al. 1998) fanden in Ihrer Arbeit sogar eine positive Korrelation zwischen der Anzahl induzierter MN *in vitro* und dem frühen Ansprechen auf RT in verschiedenen Tumorentitäten. Zamboglou et al. zeigten, dass eine Zunahme im Vergleich mit Gleichbleiben der MN Frequenz bei Kopf-Hals-Tumoren nach 10 Gy mit einer besseren Prognose einhergeht (Zamboglou et al. 1992). Gleichermaßen zeigten

Zölzer et al. für ZC, dass ein Anstieg der MN-Frequenz mit einer besseren 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit vergesellschaftet ist, wenn auch statistisch nicht signifikant, vermutlich aufgrund der niedrigen Patientenzahl (Zölzer et al. 1995).

Bereits in früheren Arbeiten wurde darauf hingewiesen, dass Methoden zur Messung der Radiosensitivität von normalen oder neoplastischen Zellen sinnvoll sind zur Vorhersage des Ansprechens der Patienten auf eine RT (Brock et al. 1989, McNally 1989, Begg et al. 1993, Raaphorst 1993, West et al. 1995). Die ZBT ist dafür eine etablierte zytogenetische Methode für die Evaluation der intrinsischen RS in Tumorzellen und PBL (Mitchell and Norman 1987, Prosser et al. 1988, Gantenberg et al. 1991, Shibamoto et al. 1991, Catena et al. 1992, Streffer 1992, Bakker et al. 1993, Catena et al. 1994, Lee et al. 1994, Zölzer et al. 1995).

Das Ausmaß der Radiosensibilisierung wurde in einigen Arbeiten mittels „Clonogenic Assays“ quantifiziert (West et al. 1989, Davidson et al. 1990, West et al. 1993), in anderen mit Zelladhäsionsmolekülen (Brock et al. 1985, Price et al. 1991, Girinsky et al. 1993). Hierbei konnte gezeigt werden, dass für einige Tumorklassen prognostische Daten bezüglich der Therapieresultate erzielt werden können durch Messung der überlebenden Fraktionen nach 2 Gy oder des anfänglichen Anstiegs der Überlebenskurve.

Zur Untersuchung gesunden Gewebes gibt es Arbeiten mit biologischen Methoden, wie z.B. den „clonogenic assay“ (Smith et al. 1980, Burnet et al. 1992, Begg et al. 1993) oder den „limiting dilution assay“ (Elyan et al. 1993a, Elyan et al. 1993b, Geara et al. 1993) bei denen die RS von Fibroblasten und PBL untersucht wurde. Aufgrund des geringen Grades an Heterogenität dieser normalen Zellpopulationen im Gegensatz zu Tumorzellen wurden diese Methoden als praktikabler, Erfolg versprechender, sowie leichter durchführbar angesehen (West et al. 1995). Häufig wurden Fibroblasten zur Bestimmung der RS gesunden Gewebes benutzt, wobei kontroverse Ergebnisse bezüglich des prädiktiven Wertes dieser Zellen beschrieben sind. Es wurde beobachtet, dass MC-Patientinnen unter RT mit schweren akuten Hautreaktionen gleichzeitig eine erhöhte fibroblastische RS hatten (Loeffler et al. 1990, Burnet et al. 1996). Oppitz et al. zeigten eine signifikante Korrelation zwischen der akuten Hautreaktion und der fibroblastischen RS mit Hilfe des „colony assay“ (Oppitz et al. 2001). Viele Studien jedoch konnten eine Korrelation auf der Basis des „clonogenic cell survival“ zwischen Fibroblasten-RS und Akutreaktionen nicht bestätigen (Geara et al. 1993, Brock et al. 1995, Johansen et al. 1996, Rudat et al. 1997). Eine signifikante Korrelation konnte dafür beobachtet werden in Studien über Fibroblasten-RS und Spätreaktionen. Geara et al. fanden

eine signifikante negative Korrelation ( $p < 0.0001$ ) zwischen dem überlebenden Anteil der Fibroblasten nach RT mit 2 Gy und Spätkomplikationen bei Kopf-Hals-Tumoren.

Bei Untersuchung von Fibroblasten während RT mit zytogenetischen Tests fanden Johansen et al. keinen Zusammenhang zwischen MN und „clonogenic cell survival“ der Fibroblasten von MC-Patientinnen, Nachtrab et al. jedoch beobachteten eine erhöhte MN Anzahl bei Patientinnen mit erhöhten Akut- und Spätnebenwirkungen (Johansen et al. 1998, Nachtrab et al. 1998).

Der Gebrauch von Fibroblasten als Testparameter für RS des normalen Gewebes scheint in prospektiven Studien klinisch nicht anwendbar zu sein, auch wegen der benötigten Zeit zur Ergebniserhebung. Daher nutzen bereits viele Labore PBL zur Bestimmung der RS von gesundem Gewebe. Es konnte bereits eine Beziehung zwischen der RS von PBL und Fibroblasten derselben Patienten festgestellt werden, was zu der Hypothese führte, dass vermutlich gemeinsame genetische Faktoren verantwortlich für beide Zellarten sein könnten (Ramsay and Birrell 1995).

West et al. (West et al. 1995) und Jones et al. (Jones et al. 1995) berichteten, dass PBL von MC-Patientinnen, die starke Akutreaktionen unter RT zeigten, auch sensitiver waren als von normalen Spendern oder Patientinnen, die den gleichen pathologischen Befund, aber keine Komplikationen aufwiesen. Auch Barbaer et al. zeigten in Ihrer Arbeit eine signifikant höhere chromosomale RS mit hohen MN-Frequenzen bei MC-Patientinnen, die starke Akutnebenwirkungen in Form von Teleangiektasie und Fibrose hatten (Barber et al. 2000). Lee et al. zeigten in einer Studie mit 8 Prostata-Ca-Patienten, die eine RT erhielten, dass die MN Frequenz in PBL nach *ex-vivo*-RT höher war bei zwei von drei Patienten mit erhöhten akuten Nebenwirkungen als bei Patienten ohne Nebenwirkungen (Lee et al. 2000). Widel et al. zeigten in Ihrer Arbeit eine erhöhte RS der PBL bei ZC-Patientinnen, die auch starke Akutnebenwirkungen hatten. Eine erhöhte RS wurde jedoch auch bei Patientinnen mit moderaten Akutnebenwirkungen beobachtet (Widel et al. 2003).

Borgmann et al. haben die CAA zur Messung der Radiosensitivität bei Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten angewandt. Dazu wurde in zwei prospektiven Studien vor Beginn der Therapie Blut entnommen und *in vitro* mit 3 oder 6 Gy bestrahlt. Die Patienten erhielten in Abhängigkeit der Tumorentität und der Lokalisation (Gehirn, Hals, Thorax, Becken, Extremitäten) 55 (40-65) Gy +/- 11 (6-31) Gy Boost (Studie A) oder 50,4 Gy +/- 10 Gy Boost (MC) (Studie B). Die individuelle Radiosensitivität war gekennzeichnet durch die unterschiedliche Ausprägung der Nebenwirkungen. Patienten mit Nebenwirkungen Grad 2/3

nach „NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events, v 2.0 (CTC AE)“ (Trotti et al. 2000) zeigten auch im *in-vitro*-Experiment eine erhöhte Radiosensitivität (Studie A,  $p=0,238$ , Studie B,  $p=0,023$ ) (Borgmann et al. 2008).

Hoeller et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen aufgetretener Fibrose im Stadium 2/3 nach LENT/SOMA und der in einem *in-vitro*-Experiment ermittelten individuellen Radiosensitivität bei adjuvant radiotherapierten MC-Patientinnen. Patientinnen mit einer hohen Radiosensitivität nach 6 Gy *in-vitro*-RT zeigten eine 2,3 fache Fibroserate 1-8 Jahre nach RT (Hoeller et al. 2003).

Auf der anderen Seite zeigten Ramsay und Birrell (Ramsay and Birrell 1995) hingegen, dass die PBL von MC Patientinnen nach *in-vitro*-RT sehr unterschiedlich reagierten, zudem gab es keine Korrelation mit dem Ansprechen auf die RT. Geara et al. (Geara et al. 1993) beobachteten eine große Variabilität der *in-vitro*-RS bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren, aber auch keine signifikante Beziehung zu Früh- oder Spätfolgen. Slonina et al. fanden ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen MN-Frequenz nach 4 Gy und Akut- ( $r = -0,23$ ,  $p = 0,58$ ) oder Spätnebenwirkungen ( $r = -0,04$ ,  $p = 0,94$ ) bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren (Slonina et al. 2000). Rached et al. untersuchten 30 Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten und konnten dabei keine signifikanten Unterschiede bezüglich der RS der PBL von Patienten mit und ohne schweren Akutreaktionen feststellen (Rached et al. 1998).

#### 4.6 Ausblick

Bei der multimodalen kurativen Therapie lokal fortgeschrittener Rektumkarzinome ist das Ansprechen der Tumore auf die neoadjuvante Therapie individuell unterschiedlich. Während es bei einigen Patienten zu einer kompletten histopathologischen Remission kommt, sprechen andere Tumore so gut wie gar nicht auf die Vorbehandlung an (Wolff HA et al. 2010). Unterschiedlich ist auch die Strahlenempfindlichkeit des Normalgewebes: Einige Patienten zeigen starke Akutreaktionen unter der Radiochemotherapie, andere hingegen weniger intensive (Wolff HA et al. 2010). In der interdisziplinären KFO 179 (Biological Basis of Individual Tumor Response in Patients with Rectal Cancer) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) an der Universitätsmedizin Göttingen werden molekularbiologische Hintergründe individueller Therapie-Erfolge mit den damit verbundenen Nebenwirkungen für den einzelnen Patienten erforscht. Ziel ist eine individualisierte Tumorthherapie des Rektumkarzinoms: Die in der Studie erworbenen

Erkenntnisse sollen in der Zukunft dazu dienen, eine Vorhersage darüber zu treffen, welcher Patient von welcher Therapie profitiert beziehungsweise mit welchen Nebenwirkungen zu rechnen ist. Die Etablierung eines Response- (Wirkung) und Toxizitäts-Scores (Nebenwirkungen) soll dann eine auf den Patienten zugeschnittene Therapie ermöglichen (personalisierte Medizin). Diese Erkenntnisse sollen dann zu einer auf den einzelnen Menschen abgestimmten Therapie führen, um den Therapieerfolg und die Lebensqualität für Menschen mit Rektumkarzinom zu erhöhen.

Erste Daten des Teilprojektes 6 der KFO 179 haben gezeigt, dass es eine Korrelation zwischen akuter Toxizität unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie und dem Tumoransprechen in Bezug auf die histopathologische Remission gibt (Wolff HA et al. 2010): Es wurde untersucht, ob es eine Korrelation zwischen einer höhergradigen akuten Organtoxizität während präoperativer Radiochemotherapie lokal fortgeschrittener Rektumkarzinome und histopathologisch kompletter Tumorregression nach totaler mesorektaler Exzision gibt. Dies wurde an einem Kollektiv von 120 Patienten, wovon 39 an einem Karzinom des Rektums im UICC-Stadium II und 81 an einem Karzinom des Rektums im UICC-Stadium III erkrankt waren, untersucht. Die präoperative Therapie dieser multimodalen Behandlung bestand aus einer normofraktionierten Bestrahlung von 50,4 Gy und einer Applikation von entweder 2 Zyklen 5-FU oder 2 Zyklen 5-FU und Oxaliplatin. Eine akute Organtoxizität in Form von Enteritis, Proktitis oder Zystitis CTC Grad  $\geq 2$  wurde als höhergradig eingestuft. Insgesamt kam es bei 35 Patienten zu einer akuten Organtoxizität  $\geq 2$  nach CTC. In dieser Gruppe erreichten 26 % der Patienten eine komplette Tumorregression. In der Gruppe ohne eine akute Organtoxizität  $\geq 2$  dem entgegen nur 9% ( $p=0,04$ ).

In einer weiteren Studie von Wolff et al. (Wolff HA et al. 2009) wurde untersucht, ob es eine Korrelation zwischen einer höhergradigen akuten Organtoxizität aufgrund einer primären Radiochemotherapie von Analkarzinomen und einer höheren 5-Jahres-Überlebensrate gibt. An einem Kollektiv von 72 Patienten, von denen 10 an einem Analkarzinom im UICC-Stadium I, 28 an einem UICC-Stadium II, 11 an einem Analkarzinom im UICC-Stadium IIIA und 13 an einem Analkarzinom im UICC-Stadium IIIB erkrankt waren. Alle Patienten wurden mit einer normofraktionierten Bestrahlung, welche das ganze Becken inklusive der iliacalen und inguinalen Lymphknoten erfasste, therapiert. Die Gesamtdosis betrug 50,4 Gy. Die begleitende Chemotherapie wurde in Form von 2 Zyklen 5-FU und Mitomycin C appliziert. Die während der Therapie aufgetretene akute Organtoxizität (Hautreaktion und/oder Proktitis/Enteritis und/oder Cystitis) wurde wöchentlich erfasst und ab einem CTC  $\geq$

3 als hochgradig eingestuft. Es zeigte sich, dass Patienten mit einer höhergradigen Organtoxizität auch eine signifikant höhere 5-Jahres-Überlebensrate und loko-regionäre Kontrolle hatten. Bei Patienten mit einer höhergradigen Organtoxizität lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei 97 %, bei den Patienten ohne eine höhergradige Organtoxizität während der Therapie lag sie lediglich bei 30% ( $p=0,01$ ). Die loko-regionäre Kontrolle lag ebenfalls bei 97% bei den Patienten mit einer höhergradigen Organtoxizität und bei 30% in der Gruppe der Patienten ohne eine höhergradige Organtoxizität während der Therapie ( $p=0,03$ ).

Nächstes Ziel im Rahmen der KFO ist es, das Auftreten von Toxizität und Tumoransprechen individuell vorhersagen zu können, um die multimodale Therapie in ihrer Intensität individuell anpassen zu können. Für die zukünftig in diesem Zusammenhang durchgeführten Analysen konnte im Rahmen dieser Arbeit der Mikronukleustest etabliert werden. Im Gegensatz zu der etablierten Methode der CAA zeichnet sich dieser durch leichtere Zählkriterien in kürzerer Zeit und dadurch validere statistische Ergebnisse aus.

Auf der Grundlage dieser Arbeit wird daher bei anstehenden Analysen des zytogenetischen Schadens zukünftig der MNT routinemäßig angewendet werden. Im Rahmen der KFO wird der zytogenetische Schaden mit dem klinischen Auftreten von Nebenwirkungen unter der Radiochemotherapie sowie dem Tumoransprechen nach Beendigung der Radiochemotherapie korreliert, um zukünftig eventuell individuell bereits zu Beginn oder zumindest vor Ende der Behandlung Nebenwirkungen und Tumoransprechen vorhersagen zu können. Dies wäre ein unerlässlicher Schritt in Richtung möglicher Individualisierung der Therapie.

## 5 Zusammenfassung

Radio- und Chemotherapie verursachen DNA-Schäden, die im Vollblut der Patienten nach Isolierung und Kultivierung von Lymphozyten nachgewiesen werden können. Der Mikronukleustest, ebenso wie die Analyse von Chromosomenaberrationen sind zuverlässige Methoden zur Darstellung von Schäden des Zellgenoms *in vivo* und *in vitro*. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ergebnisse und Durchführbarkeit beider Methoden in Bezug auf die Beurteilung der zytogenetischen Schäden verglichen. Die Patienten wurden aus der laufenden CAO/ARO/AIO-04-Studie rekrutiert. In dieser Studie werden Patienten mit fortgeschrittenen Rektumkarzinomen neoadjuvant radiochemotherapiert und entweder in Arm A mit 5-FU (1.+5. RT-Woche, 1000mg/m<sup>2</sup>/d) oder in Arm B mit 5-FU + Oxaliplatin (5-FU d 1-14 + d 22-35, 250 mg/m<sup>2</sup>/d; Oxaliplatin d1,8,22,29, 50 mg/m<sup>2</sup>/d) zusätzlich zur Bestrahlung mit 50,4 Gy (1,8 Gy/d) behandelt. Zur Darstellung des zytogenetischen Schadens wurden die bestrahlungssensiblen Lymphozyten untersucht. Diese wurden vor Beginn der Behandlung, nach 20,6 Gy und nach 50,4 Gy aus dem Vollblut der Patienten isoliert und kultiviert. Bei der Chromosomenaberrationstechnik wurde der Zellzyklus in der Metaphase durch Colcemid blockiert und die entstandenen dizentrischen Chromosomen und azentrischen Fragmente zur Beurteilung des zytogenetischen Schadens mikroskopisch validiert. Bei der Mikronukleustechnik wurde die Zytokinese bei erhaltener Karyokinese nach der 1. mitotischen Teilung durch Cyt-B blockiert und der zytogenetische Schaden durch die Anzahl der Mikronuklei und Nukleoplasmabrücken in Relation zur Anzahl zweikerniger Lymphozyten bestimmt. Eine signifikante Zunahme chromosomaler Schädigungen durch die Bestrahlung in Abhängigkeit von der applizierten Dosis konnte bei beiden Techniken, unabhängig von der applizierten Chemotherapie, beobachtet werden ( $p < 0,0001$ ). Die Gleichwertigkeit beider Methoden konnte durch den Äquivalenztest nach Westlake bei einem  $\pm \varepsilon = \pm 10\%$  gezeigt werden ( $p < 1,853 \cdot 10^{-5}$  bei 21,6 Gy,  $p < 0,01$  bei 50,4 Gy). Ein separates *in-vitro*-Experiment zeigte keine signifikante Zunahme des ZS für 5-FU oder Oxaliplatin ( $p > 0,05$ ). Die Ergebnisse beider Methoden zeigen unabhängig voneinander, dass während einer Radiochemotherapie mit zunehmender Bestrahlungsdosis ansteigende Schäden in der Lymphozyten-DNA von Rektumkarzinompatienten hervorgerufen werden. Zudem konnte die Äquivalenz der angewandten Methoden bewiesen werden, was nun die Möglichkeit bietet, den Mikronukleustest gleichwertig gegenüber der Chromosomenaberrationsanalyse anzuwenden. Die Mikronukleustechnik ermöglicht durch leichtere Zählkriterien in kürzerer

Zeit eine größere Anzahl von Zellen zu zählen, was letztendlich zu einem valideren statistischen Endergebnis führt.











## 7 Literaturverzeichnis

Abend M, Kehe K, Riedel M, Van Beuningen D (2000): Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death can be improved by considering other modes of death. *Int J Radiat Biol* 76:249-259.

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.

Antoine JL, Gerber GB, Leonard A, Richard F, Wambersie A (1981): Chromosome aberrations induced in patients treated with telecobalt therapy for mammary carcinoma. *Radiat Res* 86:171-177.

Bahl A, Chander S, Julka PK, Rath GK, Sharma DN, Kumar A, Nair O (2006): Micronuclei evaluation of reduction in neoadjuvant chemotherapy related acute toxicity in locally advanced lung cancer: an indian experience. *J Assoc Physicians India* 54:191-195.

Bakker PJ, Tukker LJ, Stap J, Veenhof CH, Aten JA (1993): Micronuclei expression in tumors as a test for radiation sensitivity. *Radiother Oncol* 26:69-72.

Barber JB, Burrill W, Spreadborough AR, Levine E, Warren C, Kiltie AE, Roberts SA, Scott D (2000): Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* 55:179-186.

Bedford JS, Mitchell JB, Griggs HG, Bender MA (1978): Radiation-induced cellular reproductive death and chromosome aberrations. *Radiat Res* 76:573-586.

Begg AC, Russell NS, Knaken H, Lebesque JV (1993): Lack of correlation of human fibroblast radiosensitivity in vitro with early skin reactions in patients undergoing radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 64:393-405.

Bender MA, Gooch PC: Chromosome aberrations in irradiated humans; in: *Progress in Radiobiology*, Vol. II. Turano L, Ratti A, Biagini C; Excerpta Medica Foundation, Amsterdam 1967, 1421-1425.

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

Bentzen SM, Overgaard M, Overgaard J (1993): Clinical correlations between late normal tissue endpoints after radiotherapy: implications for predictive assays of radiosensitivity. *Eur J Cancer* 29A:1373-1376.

Bentzen SM (1997): Potential clinical impact of normal-tissue intrinsic radiosensitivity testing. *Radiother Oncol* 43:121-131.

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

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.

Borgmann K, Hoeller U, Nowack S, Bernhard M, Röper B, Brackrock S, Petersen C., Szymczak S, Ziegler A, Feyer P, et al. (2008): Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may predict the risk of acute reaction after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71(1): 256-64.

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

Brock WA, Maor MH, Peters LJ (1985): Predictors of tumor response to radiotherapy. *Radiat Res Suppl* 8:290-296.

Brock WA, Baker FL, Peters LJ (1989): Radiosensitivity of human head and neck squamous cell carcinomas in primary culture and its potential as a predictive assay of tumor radiocurability. *Int J Radiat Biol* 56:751-760.

Brock WA, Tucker SL, Geara FB, Turesson I, Wike J, Nyman J, Peters LJ (1995): Fibroblast radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients treated for breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32:1371-1379.

Brunner E, Domhof S, Langer F (2002): Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. Wiley, New York 2002, 187-210.

Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH (1992): Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet* 339:1570-1571.

Burnet NG, Wurm R, Peacock JH (1996): Low dose-rate fibroblast radiosensitivity and the prediction of patient response to radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 70:289-300.

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

Catena C, Conti D, Del Nero A, Righi E (1992): Inter-individual differences in radiation response shown by an in vitro micronucleus assay: effects of 3-aminobenzamide on X-ray treatment. *Int J Radiat Biol* 62:687-694.

Catena C, Villani P, Conti D, Righi E (1994): Micronuclei and 3AB index in X-irradiated human lymphocytes in G0 and G1 phases. *Mutat Res* 311:231-237.

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 8,507 patients from 22 randomised trials. *Lancet* 358:1291-1304.

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

Countryman PI, Heddle JA (1976): The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 41:321-332.

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.

Davidson SE, West CM, Roberts SA, Hendry JH, Hunter RD (1990): Radiosensitivity testing of primary cervical carcinoma: evaluation of intra- and inter-tumour heterogeneity. *Radiother Oncol* 18:349-356.

Degrassi F, Tanzarella C (1988): Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy. *Mutat Res* 203:339-345.

Diener A, Stephan G, Vogl T, Lissner J (1988): The induction of chromosome aberrations during the course of radiation therapy for morbus Hodgkin. *Radiat Res* 114:528-536.

Dikomey E: Erholungsphänomene in Normal- und Tumorzellen. Refresherkurs, DEGRO, Essen 2003

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

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

Edwards AA, Lloyd DC, Purrott RJ (1979): Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution. *Radiat Environ Biophys* 16:89-100.

Elyan SA, West CM, Roberts SA, Hunter RD (1993a): Use of an internal standard in comparative measurements of the intrinsic radiosensitivities of human T-lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 64:385-391.

Elyan SA, West CM, Roberts SA, Hunter RD (1993b): Use of low-dose rate irradiation to measure the intrinsic radiosensitivity of human T-lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 64:375-383.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E (2003): HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 534: 65-75.



Fernandes TS, Lloyd D, Amaral A (2008): A comparison of different cytological stains for biological dosimetry. *Int J Radiat Biol* 84:703-711.

Fertil B, Malaise EP (1985): Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: analysis of 101 published survival curves. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11:1699-1707.

Finnon P, Lloyd DC, Edwards AA (1995): Fluorescence in situ hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry. *Int J Radiat Biol* 68:429-435.

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

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

Fuchs CS, Giovannucci 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.

Gamulin M, Kopjar N, Grgic M, Ramic S, Bisof V, Garaj-Vrhovac V (2008): Genome damage in oropharyngeal cancer patients treated by radiotherapy. *Croat Med J* 49:515-527.

Gantenberg HW, Wuttke K, Streffer C, Muller WU (1991): Micronuclei in human lymphocytes irradiated in vitro or in vivo. *Radiat Res* 128:276-281.

Garaj-Vrhovac V, Fucic A, Horvat D (1992): The correlation between the frequency of micronuclei and specific chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to microwave radiation in vitro. *Mutat Res* 281:181-186.

Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Brock WA (1993): Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 27:1173-1179.

Geard CR (1985): Charged particle cytogenetics: effects of LET, fluence, and particle separation on chromosome aberrations. *Radiat Res Suppl* 8:112-121.

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

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

Gillespie CJ, Chapman JD, Reuvers AP, Dugle DL (1975): The inactivation of Chinese hamster cells by x rays: synchronized and exponential cell populations. *Radiat Res* 64:353-364.

Girinsky T, Lubin R, Pignon JP, Chavaudra N, Gazeau J, Dubray B, Cosset JM, Socie G, Fertil B (1993): Predictive value of in vitro radiosensitivity parameters in head and neck cancers and cervical carcinomas: preliminary correlations with local control and overall survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 25:3-7.

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

Gooch PC, Bender MA, Randolph ML: Chromosome aberrations induced in human somatic cells by neutrons; in: *Biological Effects of Neutron and Proton, Irradiation, Vol. I*. International Atomic Energy Agency, Vienna 1964, 325-342.

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

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

Hatayoglu SE, Orta T (2007): Relationship between radiation induced dicentric chromosome aberrations and micronucleus formation in human lymphocytes. *J Exp Clin Cancer Res* 26:229-234.

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

Heddle JA, Carrano AV (1977): The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutat Res* 44:63-69.

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

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

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

Hoeller U, Borgmann K, Bonacker M, Kuhlmeier A, Bajrovic A, Jung H, Alberti W, Dikomey E (2003): Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* 69:137-44.

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.

Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J, Overgaard M (1996): Relationship between the in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, telangiectasia, and skin erythema after radiotherapy. *Radiother Oncol* 40:101-109.

Johansen J, Streffer C, Fuhrmann C, Bentzen SM, Stausbol-Gron B, Overgaard M, Overgaard J (1998): Radiosensitivity of normal fibroblasts from breast cancer patients assessed by the micronucleus and colony assays. *Int J Radiat Biol* 73:671-678.

Jones LA, Scott D, Cowan R, Roberts SA (1995): Abnormal radiosensitivity of lymphocytes from breast cancer patients with excessive normal tissue damage after radiotherapy: chromosome aberrations after low dose-rate irradiation. *Int J Radiat Biol* 67:519-528.

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

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

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

Kormos C, Koteles GJ (1988): Micronuclei in X-irradiated human lymphocytes. *Mutat Res* 199:31-35.

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

Kühnle, E: Med. Diss. Göttingen (2007): Spontane und in vitro strahleninduzierte Chromosomenaberrationen in Lymphozyten von Patienten mit einem Prostatakarzinom.

Lee TK, Wiley AL, Jr., Esinhart JD, Blackburn LD (1994): Radiation dose-dependent variations of micronuclei production in cytochalasin B-blocked human lymphocytes. *Teratog Carcinog Mutagen* 14:1-12.

Lee TK, O'Brien KF, Naves JL, Christie KI, Arastu HH, Eaves GS, Wiley AL, Jr., Karlsson UL, Salehpour MR (2000): Micronuclei in lymphocytes of prostate cancer patients undergoing radiation therapy. *Mutat Res* 469:63-70.

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.

Lloyd DC, Purrott RJ, Dolphin GW, Bolton D, Edwards AA, Corp MJ (1975): The relationship between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human lymphocytes. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 28:75-90.

Loeffler JS, Harris JR, Dahlberg WK, Little JB (1990): In vitro radiosensitivity of human diploid fibroblasts derived from women with unusually sensitive clinical responses to definitive radiation therapy for breast cancer. *Radiat Res* 121:227-231.

Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M (2006): Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 88:1515-1531.

Matsubara S, Sasaki MS, Adachi T (1974): Dose-response relationship of lymphocyte chromosome aberrations in locally irradiated persons. *J Radiat Res (Tokyo)* 15:189-196.

McNally NJ (1989): Can cell kinetic parameters predict the response of tumours to radiotherapy? *Int J Radiat Biol* 56:777-786.

Menz R, Andres R, Larsson B, Ozsahin M, Trott K, Crompton NE (1997): Biological dosimetry: the potential use of radiation-induced apoptosis in human T-lymphocytes. *Radiat Environ Biophys* 36:175-181.

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

Minissi S, Gustavino B, Degrassi F, Tanzarella C, Rizzoni M (1999): Effect of cytochalasin B on the induction of chromosome missegregation by colchicine at low concentrations in human lymphocytes. *Mutagenesis* 14:43-49.

Mitchell JC, Norman A (1987): The induction of micronuclei in human lymphocytes by low doses of radiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 52:527-535.

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

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

Muller WU, Streffer C (1991): Biological indicators for radiation damage. *Int J Radiat Biol* 59:863-873.

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

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

Nachtrab U, Oppitz U, Flentje M, Stopper H (1998): Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 73:279-287.

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

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.

Obe G, Johannes C, Schulte-Frohlinde D (1992): DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* 7:3-12.

Obe G, Matthiessen W, Gobel D (1981): Chromosomal aberrations in the peripheral lymphocytes of cancer patients treated with high-energy electrons and bleomycin. *Mutat Res* 81:133-141.

Oppitz U, Baier K, Wulf J, Schakowski R, Flentje M (2001): The in vitro colony assay: a predictor of clinical outcome. *Int J Radiat Biol* 77:105-110.

Padjas A, Lesisz D, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Bakalarz R, Gozdz S, Wojcik A (2005): Cytogenetic damage in lymphocytes of patients undergoing therapy for small cell lung cancer and ovarian carcinoma. *Toxicol Appl Pharmacol* 209:183-191.

Pantelias GE, Maillie HD (1984): The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry. *Radiat Res* 99:140-150.

Parker WB, Cheng YC (1990): Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol Ther* 48:381-395.

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

Pathak R, Sarma A, Sengupta B, Dey SK, Khuda-Bukhsh AR (2007): Response to high LET radiation 12C (LET, 295 keV/microm) in M5 cells, a radio resistant cell strain derived from Chinese hamster V79 cells. *Int J Radiat Biol* 83:53-63.

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

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

Prasanna PG, Escalada ND, Blakely WF (2000): Induction of premature chromosome condensation by a phosphatase inhibitor and a protein kinase in unstimulated human peripheral blood lymphocytes: a simple and rapid technique to study chromosome aberrations using specific whole-chromosome DNA hybridization probes for biological dosimetry. *Mutat Res* 466:131-141.

Price P, Bush C, Parkins CS, McMillan TJ, Robinson M, Steel GG (1991): Evaluation of cell attachment matrix (CAM) coated plates for primary culture of human tumour biopsies. *Radiother Oncol* 21:282-285.

Prosser JS, Moquet JE, Lloyd DC, Edwards AA (1988): Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res* 199:37-45.

Raaphorst GP (1993): Prediction of radiotherapy response using SF2: is it methodology or mythology? *Radiother Oncol* 28:187-188.

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* 34:378-383.

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.

Ramsay J, Birrell G (1995): Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31:339-344.

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

Rigaud O, Guedeney G, Durantou 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.

RKI: Amtliche Todesursachenstatistik; Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2000.

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

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

Rudat V, Dietz A, Conradt C, Weber KJ, Flentje M (1997): In vitro radiosensitivity of primary human fibroblasts. Lack of correlation with acute radiation toxicity in patients with head and neck cancer. *Radiother Oncol* 43:181-188.

Sala-Trepat M, Cole J, Green MH, Rigaud O, Vilcoq JR, Moustacchi E (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* 5:593-598.

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

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

Savage JR (1988): A comment on the quantitative relationship between micronuclei and chromosomal aberrations. *Mutat Res* 207:33-36.

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

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

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

Scott D, Hu Q, Roberts SA (1996): Dose-rate sparing for micronucleus induction in lymphocytes of controls and ataxia-telangiectasia heterozygotes exposed to <sup>60</sup>Co gamma-irradiation in vitro. *Int J Radiat Biol* 70:521-527.

Seoane A, Guerci A, Dulout F (2007): Genetic instability induced by low doses of x-rays in hamster cells. *Int J Radiat Biol* 83:81-87.

Shibamoto Y, Streffer C, Fuhrmann C, Budach V (1991): Tumor radiosensitivity prediction by the cytokinesis-block micronucleus assay. *Radiat Res* 128:293-300.

Shibamoto Y, Shibata T, Miyatake S, Oda Y, Manabe T, Ohshio G, Yagi K, Streffer C, Takahashi M, Abe M (1994): Assessment of the proliferative activity and radiosensitivity of human tumours using the cytokinesis-block micronucleus assay. *Br J Cancer* 70:67-71.

Shibamoto Y, Ike O, Mizuno H, Fukuse T, Hitomi S, Takahashi M (1998): Proliferative activity and micronucleus frequency after radiation of lung cancer cells as assessed by the cytokinesis-block method and their relationship to clinical outcome. *Clin Cancer Res* 4:677-682.

Singh S, Datta NR, Krishnani N, Lal P, Kumar S (2005): Radiation therapy induced micronuclei in cervical cancer--does it have a predictive value for local disease control? *Gynecol Oncol* 97:764-771.

Slonina D, Klimek M, Szpytma T, Gasinska A (2000): Comparison of the radiosensitivity of normal-tissue cells with normal-tissue reactions after radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 76:1255-1264.

Slonina D, Biesaga B, Urbanski K, Kojs Z (2008): Comparison of chromosomal radiosensitivity of normal cells with and without HRS-like response and normal tissue reactions in patients with cervix cancer. *Int J Radiat Biol* 84:421-428.

Smith KC, Hahn GM, Hoppe RT, Earle JD (1980): Radiosensitivity in vitro of human fibroblasts derived from patients with a severe skin reaction to radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 6:1573-1575.

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

Stephan G, Schneider K, Panzer W, Walsh L, Oestreicher U (2007): Enhanced yield of chromosome aberrations after CT examinations in paediatric patients. *Int J Radiat Biol* 83:281-287.

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.

Streffer C (1992): Is the micronucleus assay predictive for cellular radiosensitivity? *BJR Suppl* 24:70-73.



Thierens H, Vral A, de Ridder L (1991): Biological dosimetry using the micronucleus assay for lymphocytes: interindividual differences in dose response. *Health Phys* 61:623-630.

Thierens H, Vral A, Van Eijkeren M, Speleman F, De Ridder L (1995): Micronucleus induction in peripheral blood lymphocytes of patients under radiotherapy treatment for cervical cancer or Hodgkin's disease. *Int J Radiat Biol* 67:529-539.

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.

Thomson EJ, Perry PE (1988): The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploidy. *Mutagenesis* 3:415-418.

Trotti A, Byhardt R, Stetz J, Gwede C, Corn B, Fu K, Gunderson L, McCormick B, Morrisintegral M, Rich T et al. (2000): Common toxicity criteria: version 2.0. an improved reference for grading the acute effects of cancer treatment: impact on radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47:13-47.

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

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

Tucker SL, Turesson I, Thames HD (1992): Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. *Eur J Cancer* 28A:1783-1791.

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

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

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

Vral A, Thierens H, De Ridder L (1997): In vitro micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 71:61-68.

West CM, Davidson SE, Hunter RD (1989): Evaluation of surviving fraction at 2 Gy as a potential prognostic factor for the radiotherapy of carcinoma of the cervix. *Int J Radiat Biol* 56:761-765.

West CM, Davidson SE, Roberts SA, Hunter RD (1993): Intrinsic radiosensitivity and prediction of patient response to radiotherapy for carcinoma of the cervix. *Br J Cancer* 68:819-823.

West CM, Elyan SA, Berry P, Cowan R, Scott D (1995): A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia-telangiectasia (A-T) and A-T heterozygotes. *Int J Radiat Biol* 68:197-203.

Westlake WJ (1981): Response to T.B.L. Kirkwood: bioequivalence testing - a need to rethink. *Biometrics* 37:589-594.

Widel M, Jedrus S, Owczarek S, Konopacka M, Lubecka B, Kolosza Z (1999): The increment of micronucleus frequency in cervical carcinoma during irradiation in vivo and its prognostic value for tumour radiocurability. *Br J Cancer* 80:1599-1607.

Widel M, Kolosza Z, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek-Zwierzycka K, Swierniak A (2001): Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma; the updated analysis. *Int J Radiat Biol* 77:631-636.

Widel M, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek-Zwierzycka K, Swierniak A (2003): Radiation-induced micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes is correlated with normal tissue damage in patients with cervical carcinoma undergoing radiotherapy. *Radiat Res* 159:713-721.

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

Wolff HA, Raus I, Jung K, Schüler P, Herrmann MK, Hennies S, Vorwerk H, Hille A, Hess CF, Christiansen H (2009): High-grade acute organ toxicity as positive prognostic factor in primary radiochemotherapy for anal carcinoma. *Im Druck: Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009

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

Wolff S (1991): Biological dosimetry with cytogenetic endpoints. *Prog Clin Biol Res* 372:351-362.

Wolmark N, Wieand HS, Hyams DM, Colangelo L, Dimitrov NV, Romond EH, Wexler M, Prager D, Cruz AB, Jr., Gordon PH, et al. (2000): Randomized trial of postoperative adjuvant

chemotherapy with or without radiotherapy for carcinoma of the rectum: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol R-02. *J Natl Cancer Inst* 92:388-396.

Woynarowski JM, Faivre S, Herzig MC, Arnett B, Chapman WG, Trevino AV, Raymond E, Chaney SG, Vaisman A, Varchenko M, et al. (2000): Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. *Mol Pharmacol* 58:920-927.

Xuncla M, Barquinero JF, Caballin MR, Craven-Bartle J, Ribas M, de Vega JM, Barrios L (2008): Cytogenetic damage induced by radiotherapy. Evaluation of protection by amifostine and analysis of chromosome aberrations persistence. *Int J Radiat Biol* 84:243-251.

Zaider M (1996): The combined effects of sublethal damage repair, cellular repopulation and redistribution in the mitotic cycle. II. The dependency of radiosensitivity parameters alpha, beta and t(0) on biological age for Chinese hamster V79 cells. *Radiat Res* 145:467-473.

Zamboglou N, Streffer C, Fritzmeir CU, Bojar H, Karstens JH, Schnabel T, Kolotas C and Schmitt G (1992): Klinische Prognosefaktoren der Radioresistenz bei Kopf-Hals-Karzinomen. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichts Chir* 16:82-85.

Zölzer F, Alberti W, Pelzer T, Lamberti G, Hulskamp FH, Streffer C (1995): Changes in S-phase fraction and micronucleus frequency as prognostic factors in radiotherapy of cervical carcinoma. *Radiother Oncol* 36:128-132.

## **Danksagung**

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

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H. Christiansen, der die Durchführung der vorliegenden Studie ermöglicht und unterstützt hat und immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. A. Wolff, der mir die Thematik der Arbeit nahegebracht hat und durch seinen großen Enthusiasmus und seine konstruktive Kritik maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

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

Herrn Dr. Klaus Jung (Abteilung Medizinische Statistik) danke ich für seine Beratung bei der Auswahl der geeigneten statistischen Verfahren.

Frau Prof. Dr. rer. nat. P. Virsik danke ich für die Einarbeitung in die Chromosomenaberrationsanalyse.

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

## **Lebenslauf**

Am 25. Juli 1980 wurde ich, Steffen Hennies, als Sohn der Realschullehrerin Ingeborg Hennies und des Zahnarztes Dr. med. dent. Hartmut Hennies in Göttingen geboren.

Von 1987 bis 1990 besuchte ich die Grundschule „Lohbergschule“ in Göttingen. Nach zwei Jahren an der Orientierungsstufe „Lutherschule“ wechselte ich 1993 an das „Theodor-Heuss-Gymnasium“ in Göttingen, wo ich 2000 das Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife erlangte.

Von 2000 bis 2001 leistete ich Zivildienst als OP-Assistent im Krankenhaus Neu-Bethlehem in Göttingen.

Im Sommersemester 2002 begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Nach 4 vorklinischen Semestern absolvierte ich im Sommersemester 2004 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, nach 6 folgenden klinischen Semestern und dem Praktischen Jahr absolvierte ich 2008 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Während meines Studiums arbeitete ich als studentischer Tutor im Lernzentrum „Herz-Kreislauf-Gefäße“ der Universität Göttingen.