

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Würzburg  
Lehrstuhl für Toxikologie  
Kommissarische Leitung: Professor Dr. Helga Stopper

**Mikrokernbildung in Mundschleimhautzellen von Patienten mit  
Kopf-Hals-Tumoren während Radio-/Radiochemotherapie**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Victoria Kristina Schewe  
aus Stuttgart

Würzburg, Mai 2020

Referentin: Professor Dr. Helga Stopper

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Bülent Polat

Dekan: Professor Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2020

Die Promovendin ist Zahnärztin

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Strategien der Tumorbehandlung	1
1.1.1	Chirurgische Behandlung	2
1.1.2	Strahlentherapie	3
1.1.2.1	Biologische Wirkung ionisierender Strahlung	4
1.1.2.2	Intensitätsmodulierte Strahlentherapie	5
1.1.3	Radiochemotherapie	6
1.1.3.1	Biologische Wirkung von Chemotherapeutika während Radiochemotherapie	7
1.1.3.2	Cisplatin	8
1.1.3.3	5-Floururacil	9
1.1.3.4	Cetuximab	10
1.2	Mikrokerntest	10
1.3	Mikrokernbildung im Zusammenhang mit Radiotherapie	14
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	Probandenkollektiv	19
3.1.1	Tumorpatienten	19
3.1.2	Negativkontrollen	21
3.2	Materialien	21
3.3	Methoden	22
3.3.1	Herstellung der Präparate	22
3.3.2	Färbung der Präparate	23
3.3.3	Mikrokerntest	23
3.4	Statistik	26
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
4.1	Probandenkollektiv	27
4.2	Vergleich der Mikrokernraten der Wochen 0 bis 6	28
4.3	Vergleich der Mikrokernraten bei Radio-/Radiochemotherapie zum selben Zeitpunkt	31
4.4	Vergleich der Mikrokernraten vor Behandlungsbeginn und nach Behandlungsabschluss	33

4.5	Vergleich der Mikrokernraten nach Geschlecht .....	35
4.6	Vergleich der Mikrokernraten nach Alter .....	37
4.7	Vergleich der Mikrokernraten nach Grading .....	39
4.8	Vergleich der Mikrokernraten nach T-Stadium.....	41
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>68</b>
8.1	Chemotherapieansätze .....	68
8.2	Auswertungsergebnisse.....	70
8.3	Verwendete Materialien .....	72

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Therapieansätze bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich; modifiziert nach Dietz (2009).....	2
Abb. 2: Strukturformel Cisplatin.....	8
Abb. 3: Wirkungsmechanismus von 5-Floururacil (5-FU); modifiziert nach Miura et al. (2010).....	9
Abb. 4: Schematische Darstellung der Entstehung mikrokernhaltiger Zellen während der Mitose aus ganzen Chromosomen (3a) oder Chromosomenfragmenten (3b); dargestellt sind die Ausgangszelle (1), Metaphase (2), Anaphase (3a und b) und die abgeschlossene Zellteilung mit Mikrokernen aus aneugenen (4a) und klastogenen Schäden (4b); modifiziert nach Andrae (1996).....	12
Abb. 5: Schematische Darstellung der Entstehung nuklearer Anomalien (Thomas et al., 2009); mit Genehmigung des Verlages.....	13
Abb. 6: Zellaufnahmen mit einer anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper/Chromomycin A <sub>3</sub> Färbung unter 40-facher Vergrößerung: (a) 1 MK/Zelle (b) 2 MK/Zelle (c) doppelkernige und einkernige Zelle (d) kondensiertes Chromatin (e) fragmentierter Zellkern (f) Pyknose (g) Karyolyse .....	25
Abb. 7: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche; dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ Standardfehler, * $p < 0,05$ oder ** $p < 0,01$ im Vergleich zu Woche 0 .....	28
Abb. 8: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche; Ergebnisse für Negativkontrollen (NK), Radiotherapie (RT) und Radiochemotherapie (RCT); dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ Standardfehler, * $p < 0,05$ im Vergleich zu Woche 0 derselben Gruppe .....	30

- Abb. 9: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche und 9-12 Wochen nach Behandlungsbeginn; Ergebnisse für Radiotherapie (RT) und Radiochemotherapie (RCT); dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $p < 0,05$  im Vergleich RT zu RCT zum selben Zeitpunkt..... 32
- Abb. 10: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten vor Behandlungsbeginn und nach Behandlungsabschluss; dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $p < 0,05$  im Vergleich zueinander. 33
- Abb. 11: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten vor Behandlungsbeginn und nach Behandlungsabschluss; Ergebnisse für Negativkontrollen (NK), Radiotherapie (RT) und Radiochemotherapie (RCT); dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $p < 0,05$  im Vergleich vor Behandlungsbeginn und nach Behandlungsabschluss derselben Gruppe..... 34
- Abb. 12: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche und 9-12 Wochen nach Behandlungsbeginn; Ergebnisse für Männer und Frauen; dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $p < 0,05$  im Vergleich Männer zu Frauen zum selben Zeitpunkt..... 36
- Abb. 13: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche und 9-12 Wochen nach Behandlungsbeginn; Ergebnisse Patientenalter  $> 60$  Jahre und  $\leq 60$  Jahre; dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $p < 0,05$  im Vergleich der Altersgruppen zum selben Zeitpunkt..... 38
- Abb. 14: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche und 9-12 Wochen nach Behandlungsbeginn; Ergebnisse Gradingeinstufungen (G) von G1 bis G3; dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $p < 0,05$  im Vergleich der Gratings zum selben Zeitpunkt..... 40

Abb. 15: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche und 9-12 Wochen nach Behandlungsbeginn; Ergebnisse Tumorgröße (T) nach der TNM Klassifikation von T1 bis T4; dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, \*  $p < 0,05$  im Vergleich der T-Stadien zum selben Zeitpunkt..... 42

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Chemotherapieregime Cisplatin wöchentlich .....	68
Tab. 2: Chemotherapieregime Cisplatin mono .....	68
Tab. 3: Chemotherapieregime Cisplatin/5-FU .....	68
Tab. 4: Chemotherapieregime Cisplatin/Cetuximab .....	69
Tab. 5: Chemotherapieregime Cetuximab/Cisplatin/5-FU .....	69
Tab. 6: Angaben zu Geschlecht und Alter der Patienten sowie Lokalisation, Grading und Staging des Tumors und zur Therapie bezüglich verabreichter Einzeldosen, Fraktionen und Chemotherapie der Patienten; * ausgeschlossener Patient.....	70
Tab. 7: Angaben zu Geschlecht und Alter der Negativkontrollen sowie die Auswertungsergebnisse: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten: Woche 0, 2, 4, 6 und 9-12.....	71
Tab. 8: Auswertungsergebnisse: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche und 9-12 Wochen nach Behandlungsbeginn; * ausgeschlossener Patient .....	71
Tab. 9: Verwendete Chemikalien .....	72
Tab. 10: Verwendete Materialien.....	72
Tab. 11: Verwendete Geräte .....	72

## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
5-FU	5-Floururacil
Abb.	Abbildung
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
CUP	Cancer of Unknown Primary
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor receptor
et al.	et alii
ETOH	Ethanol
FdUDP	5-Flouro-desoxyuridindiphosphat
FdUMP	5-Flouro-desoxyuridinmonophosphat
FdUrd	5-Flouro-desoxyuridin
FdUTP	5-Flouro-desoxytriphosphat
FITC	Flouresceinisothiocyanat
FUDP	5-Flourouridindiphosphat
FUMP	5-Flourouridinmonophosphat
FUrd	5-Flourouridin
FUTP	5-Flourouridintriphosphat
g	Gramm
G	Grading
Gy	Gray
h	Stunde
HPV	Humane-Papillom-Viren
H <sub>2</sub> O	Wasser
HUMN	The Human Micronucleus Project
Ig	Immunglobulin
IMRT	Intensity Modulated Radiation Therapy
KCl	Kaliumchlorid

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
mg	Milligramm
$\text{MgCl}_2$	Magnesiumchlorid
$\text{mg/m}^2$	Milligramm pro Quadratmeter
min	Minute
MK	Mikrokern
ml	Milliliter
$\text{ml/m}^2$	Milliliter pro Quadratmeter
mM	Millimolar
MSH	Mundschleimhaut
N	Lymphknotenmetastasierung
NaCl	Natriumchlorid
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Natriumhydrogenphosphat
$\text{NH}_3$	Ammoniak
NK	Negativkontrolle
PBS	Phosphate buffered Saline
Pt	Platin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per Minute
RCT	Radiochemotherapie
RT	Radiotherapie
T	Tumorgröße
Tab.	Tabelle
Tris HCL	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Salzsäure

# 1 Einleitung

## 1.1 Strategien der Tumorbehandlung

Maligne Tumore sind durch ihr rasches, infiltratives, invasives und destruierendes Wachstum gekennzeichnet. Sie neigen häufig zur Bildung von Metastasen und Lokalrezidiven. Bei Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich kann es häufig auch zur Bildung von Zweittumoren kommen. Dabei liegt die Häufigkeit an einem Zweittumor zu erkranken bei etwa 14 % (Haughey et al., 1992). Bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich werden die Tumorzellen meistens erst lymphogen verschleppt und bilden später Fernmetastasen über den hämatogenen Weg. Dabei liegt die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Fernmetastasen bei über 10 % (de Bree et al., 2000).

Die vorrangigen Ziele der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren sind eine dauerhafte oder möglichst lange lokoregionäre Tumorkontrolle mit Erhaltung des Lebens und der Lebensqualität des Patienten ohne funktionelle und ästhetische Einschränkungen. Es gibt drei Methoden, welche zur Therapie von Neoplasien im Kopf-Hals-Bereich eingesetzt und unterschiedlich miteinander kombiniert werden können: operative Entfernung des Tumors, Radiatio und Chemotherapie (Abb. 1). Welche Art der Behandlung angestrebt wird, ist vom Allgemeinzustand und der Compliance des Patienten, der histologischen Beschaffenheit, dem Malignitätsgrad sowie der Lage, Größe und Ausbreitung des Tumors abhängig.

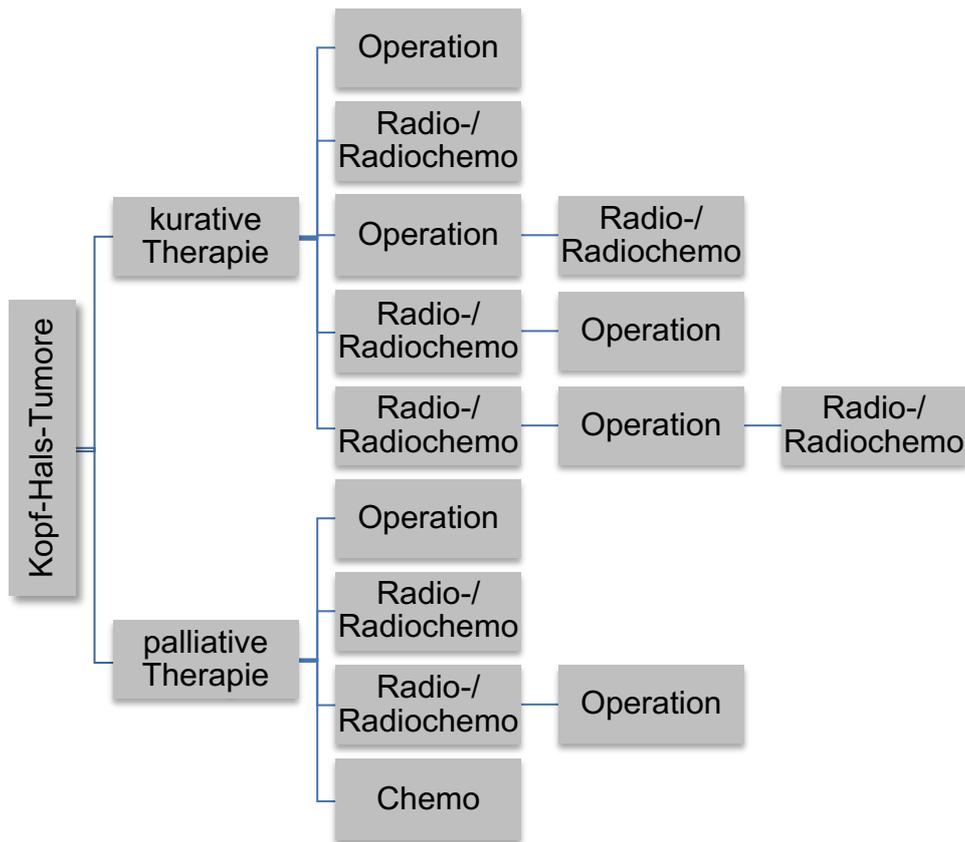


Abb. 1: Therapieansätze bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich; modifiziert nach Dietz (2009)

### 1.1.1 Chirurgische Behandlung

Die vollständige Entfernung des Tumors und der Lymphknotenmetastasen ist das Ziel einer chirurgischen Therapie bei kurativer Intention. Ist es aufgrund der Größe primär nicht möglich den gesamten Tumor zu entfernen, kann dieser durch eine neoadjuvante Radio- bzw. Chemotherapie im Sinne eines „*down-gradings*“ vorbehandelt werden.

Bei frühen Tumorstadien (T1 N0 G1/G2) ist eine alleinige Operation meist ausreichend (Schwenzer-Zimmerer et al., 2010). Einen palliativen Therapieansatz schlägt man ein, wenn aufgrund von anatomischen und/oder funktionellen Gründen keine Vollresektion möglich ist. Weitere Gründe dafür können Fernmetastasen sowie eine lokale oder internistische Inoperabilität sein. Das vorrangige Ziel ist es, Symptome des Tumors zum Beispiel durch Tumorverkleinerung oder Metastasenchirurgie zu lindern und damit die Lebensqualität des Patienten zu erhöhen.

## 1.1.2 Strahlentherapie

Das Ziel der Strahlentherapie ist eine maximale Remission des Tumorgewebes und/oder der Metastasen bei gleichzeitig möglichst minimaler Schädigung des gesunden umliegenden Gewebes. Patienten mit Tumoren ab T2, welche gut resektabel sind, sollten aufgrund der hohen Rezidivraten von Kopf-Hals-Tumoren postoperativ strahlentherapeutisch behandelt werden (Rodgers et al., 1993; Knecht, 2009; Schwenger-Zimmerer et al., 2010). Die postoperative Strahlentherapie sollte spätestens sechs Wochen nach der Operation erfolgen. Des Weiteren sollte die Behandlung 11 Wochen postoperativ abgeschlossen sein, da ansonsten eine höhere Lokalrezidivrate zu erwarten ist (Schwenger-Zimmerer et al., 2010).

Die Gesamtdosis wird in Einzeldosen, sogenannten Fraktionen, verabreicht. Bei Plattenepithelkarzinomen wird eine Gesamtdosis von 60 bis 70 Gy angestrebt. Die Normofraktionierung liegt bei 1,8 bis 2,0 Gy. Man unterscheidet zwischen verschiedenen Vorgehensweisen:

- Konventionelle Fraktionierung:  
Einzeldosen von 1,8 bis 2,0 Gy werden täglich für fünf Tage pro Woche über einen Zeitraum von fünf bis sieben Wochen verteilt.
- Akzelerierte Fraktionierung:  
Einzeldosen werden erhöht oder mehrfach tägliche Fraktionierungen von 1,8 bis 2,0 Gy eingesetzt, wodurch die Behandlungszeit auf zwei bis zweieinhalb Wochen verkürzt wird.
- Hyperfraktionierte Fraktionierung:  
Konventionelle Einzelfraktionen werden auf zwei Einzeldosen von 1,0 bis 1,2 Gy am Tag verteilt auf fünf Tage pro Woche für fünf bis sieben Wochen.
- Hyperfraktionierte, akzelerierte Fraktionierung:  
Mehrere Einzeldosen von 1,4 bis 1,6 Gy täglich mit erhöhter Gesamtdosis, wodurch die Behandlungszeit auf zwei bis zweieinhalb Wochen verkürzt wird.

- Hypofraktionierte Fraktionierung:  
Erhöhte Einzeldosis von 3,5 bis 5 Gy, dafür aber nur ein- bis zweimal wöchentlich.

### 1.1.2.1 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung

Für die Therapie von Tumoren durch Bestrahlung wird ionisierende Strahlung zur Schädigung der DNA verwendet (Dizdaroglu, 1992; Huang et al., 2011). Der Effekt der Strahlung auf das Gewebe kann direkt oder indirekt sein. Bei der direkten Wirkung finden die Energieübertragung und biologische Wirkung im selben Biomolekül statt, welches durch Anregung und Ionisation verändert wird. Dagegen wird bei der indirekten Wirkung die Energie über die Ionisation von Wasser absorbiert und die biologische Wirkung erfolgt in unterschiedlichen Strukturen. Die menschliche Zelle besteht zu 80 % aus Wasser, welches die Energie der Strahlung absorbiert und durch Radiolyse Hydroxylradikale bildet (Ward, 1988). Diese können mit Sauerstoff weiter zu Peroxidradikalen reagieren. Die gebildeten Ionen und Radikale führen zu Veränderungen der DNA-Struktur von Zellen. Bei locker ionisierender Strahlung entstehen 65 bis 70 % der Schäden aus der indirekten Wirkung, bei der dichten ionisierenden Strahlung hingegen überwiegt der Anteil der direkten Wirkung. Des Weiteren kann durch den Sauerstoffeffekt die Wirkung verstärkt werden und der Tumor reagiert 2- bis 3,5-fach sensibler aufgrund der höheren Ausbeute während der Wasserradiolyse. In Tumoren mit Hypoxie oder Anoxie wirkt die Bestrahlung daher schlechter als in Tumoren mit ausreichender Durchblutung und höherem Sauerstoffgehalt (Littbrand und Revesz, 1969). Die Folge der direkten und indirekten Strahlenwirkung sind Basenschäden, Strangbrüche, DNA-Vernetzung, Schädigung der Wasserstoffbrücken und „*bulky lesions*“. Die Zelle kann auf die erfolgte DNA-Schädigung durch Apoptose, Reparaturmechanismen oder Zellzyklusarrest reagieren. Die Reparaturmechanismen in Tumoren erfolgen jedoch langsamer als in der gesunden Zelle (Barranco et al., 1971). Durch Fraktionierung kann sich das gesunde Gewebe wieder erholen, während die Tumorzellen maximal geschädigt werden. Zellen sind in der Mitose und der G<sub>2</sub>-Phase am strahlenempfindlichsten, während sie in der S-Phase strahlenresistenter sind.

### 1.1.2.2 Intensitätsmodulierte Strahlentherapie

Bei der konventionellen Strahlentherapie weist jeder Punkt des Bestrahlungsfeldes die gleiche Intensität auf. Dies kann bei Tumoren, welche sich in der Nähe von Risikoorganen befinden, zu Problemen führen. Die intensitätsmodulierte Strahlentherapie (*Intensity Modulated Radiation Therapy* = IMRT) bietet einen Ansatz zur Vermeidung dieses Problems. Bei dieser Art der Bestrahlung wird die Intensität innerhalb des Bestrahlungsfeldes für jeden Patienten individuell moduliert. Dadurch entsteht ein Strahlungsfeld mit vielen kleinen Strahlenteilfeldern, welches sich als ein „Dosisgebirge“ darstellt. IMRT ermöglicht dadurch ein höheres Zielvolumen am Tumor. Durch die gewünschte Inhomogenität kommt es zur Verbesserung der Dosisverteilung am Zielvolumen mit guten lokoregionären Kontrollraten und gleichzeitiger Schonung der umgebenden Strukturen (Lee et al., 2002; Kam et al., 2004). Das spielt vor allem eine Rolle bei Tumoren, welche hypoxische Areale aufweisen, die insbesondere bei aggressiven Phänotypen vorkommen (Koukourakis et al., 2002) und im Zusammenhang mit einem Therapieversagen von Chirurgie, Chemo- und konventioneller Strahlentherapie stehen (Nordsmark et al., 2005). Die hypoxischen Areale liegen vor allem im Inneren des Tumors, während die Ränder durch Diffusion oder Perfusion versorgt werden. Eine höhere Strahlendosis im Tumorrinneren kann deshalb die Tumorkontrolle verbessern (Pigorsch et al., 2017). Diese Art der Bestrahlung ist vor allem für Tumore geeignet, welche sich in der Nähe von Risikoorganen befinden und welche eine konkave Form aufweisen. Es konnten gute Ergebnisse für Tumore mit knappen Resektionsrändern, Beteiligung der Lymphknoten, größere Tumorstadien als T1 N0 oder Rezidiven erzielt werden (Studer et al., 2006). Gerade bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich kommt es häufig zu einer Xerostomie, da Speicheldrüsen im Bestrahlungsfeld liegen. Durch Schonung, zum Beispiel der Parotis, kann dies vermindert und die Lebensqualität des Patienten gesteigert werden (Kwong et al., 2004; Kam et al., 2007).

### 1.1.3 Radiochemotherapie

Durch die Kombination einer Radiatio mit einer Chemotherapie wird angestrebt, die Kontrolle des Tumors durch additive und supraadditive Effekte zu verstärken und damit die Fern- und Mikrometastasierung einzuschränken. Da Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich chemosensibel reagieren, sollten sich Patienten mit erhöhtem Rezidivrisiko zusätzlich zur Operation einer Radiochemotherapie unterziehen (Bernier et al., 2004; Cooper et al., 2004). Zu den Faktoren für ein erhöhtes Rezidivrisiko zählen Patienten mit positiven Resektionsrändern, extrakapsulärem Wachstum befallener Lymphknoten (Bernier et al., 2005), Befall der kaudojugulären Lymphknoten und der Lymphknoten des posterioren Dreiecks, Metastasen in zwei und mehr Halslymphknoten, Tumoren ab T3, perineuraler Invasion und Gefäßinvasion (Cooper et al., 1998). Bereits bei Vorliegen nur eines Risikofaktors sollte eine Radiochemotherapie in Betracht gezogen werden. Für die Kombination von Chemo- und Strahlentherapie konnten eine Verbesserung der Tumorkontrolle und eine rezidivfreie Gesamtüberlebensrate von 8 % nachgewiesen werden (Pignon et al., 2009). Die Radiochemotherapie führt allerdings zu einer höheren Strahlentoxizität, wie zum Beispiel Mukositis. Eine alleinige Chemotherapie führt bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren nicht zur einer Verbesserung der Tumorkontrolle oder Überlebensvorteilen (Pignon et al., 2000). Sie wird daher nur im Rahmen der palliativen Behandlung eingesetzt.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die beiden Behandlungsmethoden miteinander zu kombinieren. Bei der simultanen Radiochemotherapie finden beide Behandlungen zeitnah innerhalb eines Tages statt. Im Unterschied dazu erfolgen bei der sequenziellen Radiochemotherapie beide Therapien separat. Meistens werden dabei der Radiatio zwei bis drei Zyklen Chemotherapie vorgeschaltet. Bei der alternierenden Chemotherapie wechseln sich Chemo- und Strahlentherapie in bestimmten Abständen ab. Die Chemotherapeutika können sowohl im Rahmen einer Monotherapie als auch in Kombination verwendet werden.

### **1.1.3.1 Biologische Wirkung von Chemotherapeutika während Radiochemotherapie**

Es gibt zwei mögliche Wirkungsweisen der Radiochemotherapie: zum einen durch eine räumliche Kooperation und zum anderen durch eine lokale Wirkungsverstärkung. Beim ersten Effekt kontrollieren die Zytostatika durch ihre systemische Wirkung zum Beispiel Mikrometastasen, während der Tumor durch die Strahlentherapie angegriffen wird. Beide Therapien agieren dabei voneinander unabhängig und sollten auch zeitlich getrennt voneinander durchgeführt werden. Diese Art der Chemotherapie wird zum Beispiel bei malignen Lymphomen angewendet. Bei dem zweiten Effekt unterscheidet man zwischen supraadditiver und additiver Wirkung (Steel und Peckham, 1979). Bei der supraadditiven Wirkung ist die Summationswirkung größer als die Addition der Einzeleffekte. Dadurch kommt es zu einer Verbesserung der lokalen Strahlenwirkung am Tumor, weshalb die Zytostatika auch als Radiomodulatoren bezeichnet werden. Dazu gehören die Radiosensitizer wie Cisplatin und 5-Floururacil. Diese Variante findet zum Beispiel bei soliden Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich im Rahmen einer simultanen Radiochemotherapie Anwendung. Bei der additiven Wirkung entspricht die Summationswirkung der Addition der Einzeleffekte. Dabei wirken Strahlen- und Chemotherapie getrennt am Tumor.

Zytostatika hemmen oder verhindern die Proliferation von Zellen. Man differenziert zwischen drei verschiedenen Gruppen von Chemotherapeutika, welche sich in ihren Angriffspunkten unterscheiden:

- Zyklusabhängige und phasenspezifisch wirkende Zytostatika greifen nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus sich teilender Zellen an.
- Zyklusabhängige und phasenunspezifisch wirkende Zytostatika greifen in allen Phasen des Zellzyklus sich teilender Zellen an.
- Zyklusunabhängig wirkende Zytostatika greifen auch Zellen in der  $G_0$ -Phase an.

### 1.1.3.2 Cisplatin

Cisplatin ist ein seit 1979 in Deutschland zugelassener Radiosensitizer und hat sich als Chemotherapeutikum für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich in den letzten Jahrzehnten gut bewährt. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass durch eine Radiotherapie mit simultaner Gabe von Cisplatin das Dreijahresgesamtüberleben deutlich von 23 % auf 37 % verbessert werden konnte (Adelstein et al., 2003). Es ist ein anorganischer, wasserlöslicher Platinkomplex und gehört zur Gruppe der Alkylanzien (Abb. 2). Man kann Cisplatin sowohl als alleiniges Chemotherapeutikum einsetzen als auch gut mit anderen Zytostatika kombinieren.

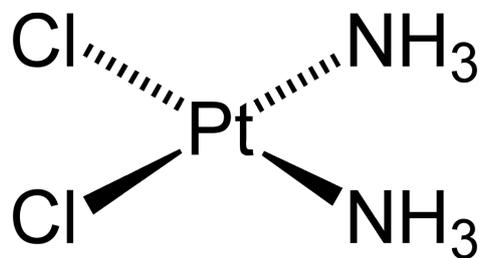


Abb. 2: Strukturformel Cisplatin

Extrazellulär liegt Cisplatin ungeladen vor und kann somit durch passive Diffusion in das Zellinnere gelangen. Durch die dort vorliegende niedrige Chloridionen-Konzentration werden die Chloratome des Cisplatins gegen Wasserreste ausgetauscht, wodurch ein hochreaktiver Aquakomplex entsteht (Rosenberg et al., 1969). Aufgrund der positiven Ladung können diese Komplexe die Zelle kaum verlassen. Cisplatin bildet durch kovalente Bindungen mit der DNA innerhalb der Zelle DNA-Intrastrang- und Interstrangquervernetzungen und hemmt somit die DNA-Synthese (Garcia Sar et al., 2008). Die bevorzugte Bindestelle von Cisplatin ist das N7-Atom von Guanin und Adenin. Es wird ebenfalls angenommen, dass Cisplatin die DNA-Reparatur von subletalen Zellen hemmt (Coughlin und Richmond, 1989).

### 1.1.3.3 5-Floururacil

Seit 1962 ist 5-Floururacil (5-FU) auf dem Markt erhältlich und ein in der Tumorthherapie häufig genutztes Chemotherapeutikum. Es konnte gezeigt werden, dass die simultane Chemotherapie mit 5-FU und Cisplatin die lokale Kontrolle von 32 % auf 64 % und die Überlebensrate nach fünf Jahren von 9 % auf 21 % steigert (Merlano et al., 1996). 5-FU ist ein Pyrimidinanalogon und entwickelt seine zytostatische Wirkung erst nach enzymatischer Aktivierung (Abb. 3) und gehört zu den zyklusabhängigen und phasenspezifisch wirkenden Zytostatika, wobei der Angriffspunkt von 5-FU in der S-Phase liegt (Peters et al., 2000).

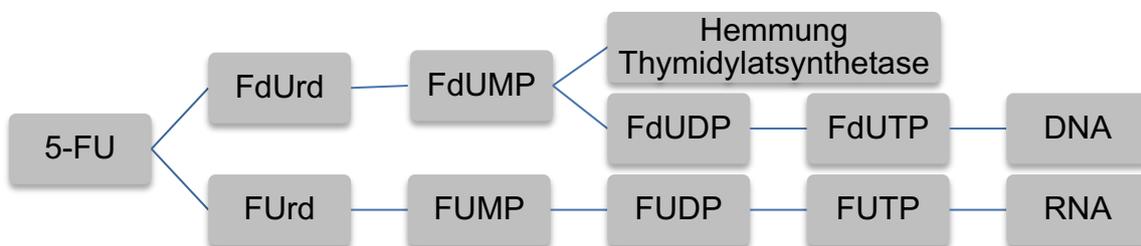


Abb. 3: Wirkungsmechanismus von 5-Floururacil (5-FU); modifiziert nach Miura et al. (2010)

FdUrd: 5-Flouro-desoxyuridin; FdUMP: 5-Flouro-desoxyuridinmonophosphat;  
 FdUDP: 5-Flouro-desoxyuridindiphosphat; FdUTP: 5-Flouro-desoxytriphosphat;  
 FUrd: 5-Flourouridin; FUMP: 5-Flourouridinmonophosphat; FUDP: 5-Flouro-  
 uridindiphosphat; FUTP: 5-Flourouridintriphosphat

5-FU wird in der Zelle zu 5-Flourdesoxy-Uridinmonophosphat (FdUMP) bioaktiviert. Dieser aktive Metabolit wiederum hemmt die Thymidylatsynthetase, welche von Bedeutung für die DNA-Synthese ist. Wie in Abbildung 3 dargestellt wird des Weiteren FdUTP, welches aus FdUMP metabolisiert wird, aufgrund der Strukturähnlichkeit fälschlicherweise an Stelle des Pyrimidins Thymidin in die DNA eingebaut. Dies führt durch Hemmung der Verlängerung der DNA-Ketten und einer reduzierten DNA-Stabilität zu Einzelstrangbrüchen und Störungen der DNA-Replikation. Die RNA-Synthese wird durch den Einbau von FUTP anstelle von Uracil, welches vermehrt in Tumorzellen eingebaut wird (Heidelberger et al., 1957), gestört.

### **1.1.3.4 Cetuximab**

Cetuximab gehört zu den neueren Wirkstoffen in der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren im Rahmen der Immuntherapie. Es ist seit 2004 für die Behandlung von Kolorektalkarzinomen zugelassen und 2008 wurde die Zulassung dann auch auf Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich erweitert. Bei Kopf-Hals-Tumoren wird der Wirkstoff zusätzlich zur Strahlentherapie für lokal fortgeschrittene Tumore oder bei rezidivierenden und/oder metastasierenden Erkrankungen mit auf Platin basierenden Zytostatika kombiniert eingesetzt. Die Kombination von Cetuximab zur Strahlentherapie mit einer platinhaltigen Chemotherapie alleine oder zusätzlich mit 5-Floururacil erhöht die Überlebenschancen deutlich (Burtness et al., 2005; Bourhis et al., 2006; Vermorken et al., 2008). Bei alleiniger Gabe von Cetuximab zur Strahlentherapie verbessern sich sowohl die Zweijahrestumorkontrolle als auch die progressionsfreie Überlebensrate um etwa 10 % ohne eine Zunahme der Strahlentoxizität (Bonner et al., 2010).

Bei Cetuximab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper der Gruppe IgG1. Er bindet an die Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR-1, welche für die Proliferation von Zellen von Bedeutung ist. Auf Tumorzellen wird vermehrt EGFR-1 exprimiert, womit es durch die Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors zu der charakteristischen Beschleunigung der Zellteilung in Tumoren kommt, was mit einer schlechteren Prognose für den Patienten assoziiert ist (Rubin Grandis et al., 1998). Die Wirkung von Cetuximab beruht damit auf der Hemmung der Proliferation von Tumorzellen (Huang et al., 1999) und hat eine 5- bis 10-fach höhere Affinität zu EGFR-1 als körpereigene Wachstumsfaktoren.

## **1.2 Mikrokerntest**

Mikrokerne dienen als Biomarker für genotoxische Expositionen zur näheren Erforschung der Einflüsse der Umwelt, des Berufes, der Lebensweise und der Ernährung auf das Zellsystem (Holland et al., 2008). Unter Biomarkern versteht man Merkmale, die objektiv gemessen werden können und als Indikatoren für normale oder pathogene Prozesse sowie für pharmakologische Reaktionen auf

eine therapeutische Behandlung dienen (Biomarkers Definitions Working, 2001). Der Mikrokernstest wurde zum ersten Mal von Boller und Schmid (1970) im Rahmen einer Studie beschrieben und seitdem stetig weiterentwickelt und verbessert. Eine Standardisierung des Mikrokernstests an Mundschleimhautzellen wurde vor allem im Rahmen des HUMN (The Human Micronucleus Projekt) im letzten Jahrzehnt vorangetrieben. Da der Zugang zum Probenmaterial ohne große Beeinträchtigung für den Patienten möglich ist, eine unbegrenzte Zahl an Zellen zur Verfügung steht und er in vivo durchgeführt werden kann, wird er vor allem für epidemiologische Studien herangezogen. Man wendet ihn in Erythrozyten, Lymphozyten und Epithelzellen an.

Mit 90 % entwickelt sich der größte Teil der Tumore aus Epithelzellen (Cairns, 1975). Die Mundschleimhaut ist die erste Barriere, wenn es um die Aufnahme von Substanzen geht. Die Schleimhaut der Wange besteht wie alle auskleidenden Schleimhäute aus einem mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel und einer Lamina propria. Sie lässt sich in ein Stratum germinativum, Stratum intermedium und Stratum superficiale unterteilen. In der untersten Schicht befinden sich die mitotisch aktiven Basalzellen, welche während ihrer Differenzierung an die Oberfläche wandern. Die oberste Zellschicht wird dann im Laufe der Zeit abgeschilfert. Da die Zellen nicht verhornen, sind bis in die oberste Schicht Zellkerne zu beobachten.

Mikrokerne (MK) sind chromatinhaltige Strukturen, welche neben dem normalen Zellkern im Zytoplasma anzufinden sind und eine Doppelmembran mit Poren aufweisen. Sie können entweder ganze Chromosomen durch Schädigung der Spindel und/oder des Kinetochors enthalten, in diesem Fall spricht man von einem aneugenem Schaden, oder DNA-Fragmente, einem sogenannten klastogenen DNA-strangbrechenden Schaden (Abb. 4) (Schmid, 1975).

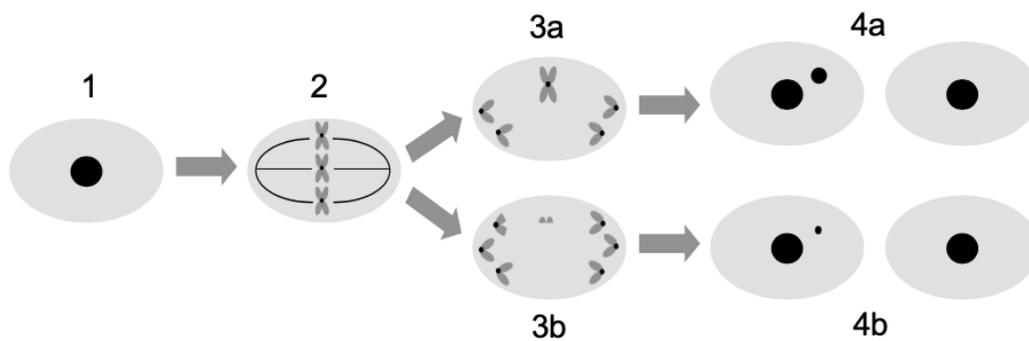


Abb. 4: Schematische Darstellung der Entstehung mikrokernhaltiger Zellen während der Mitose aus ganzen Chromosomen (3a) oder Chromosomenfragmenten (3b); dargestellt sind die Ausgangszelle (1), Metaphase (2), Anaphase (3a und b) und die abgeschlossene Zellteilung mit Mikrokernen aus aneugenen (4a) und klastogenen Schäden (4b); modifiziert nach Andrae (1996)

Vorraussetzung für die Bildung von Mikrokernen ist eine erfolgreiche Zellteilung. Zellen teilen sich nach Verdoppelung der Chromosomen in der S-Phase in der Mitose, die in fünf Phasen eingeteilt ist. Während der Prophase kondensieren die Chromosomen, die Zentrosomen teilen sich und bilden mit Spindel-Mikrotubuli den Spindelapparat. Durch den Zerfall der Kernhülle in der Prometaphase können sich die Chromosomen an die Mikrotubuli des Spindelapparates heften. Die Chromosomen werden in der Metaphase durch den Zug des Spindelapparates in die Mitte der Spindel gezogen. Sobald sich die Chromatiden trennen tritt die Anaphase ein und die Schwesterchromatiden werden zum entsprechenden Zellpol transportiert. In der anschließenden Telophase dekondensieren die Chromatiden und eine neue Kernhülle wird gebildet. Die Spindelapparate bilden sich zurück und die Zelleibdurchtrennung beginnt. Die Proliferation wird durch die Zytokinese, der vollständigen Zellteilung, beendet.

Man geht davon aus, dass Mikrokerne während der Mitose gebildet werden, indem während der Anaphase das Chromosom oder ein Chromosomenfragment durch eine fehlerhafte Erfassung des Spindelapparats nicht in den Zellkern integriert werden kann und dadurch in der Äquatorialebene verbleibt (Fenech et al., 1999; Fenech und Crott, 2002). Daher sind Mikrokerne ein Zeichen für eine chromosomale Instabilität. Die Genomschädigung ist ein Hinweis auf eine Entartung der Zelle und in der Phase der Initiation der Kanzerogenese zu beobachten. Mikrokerne können sowohl spontan entstehen

als auch durch endogene und exogene Faktoren begünstigt werden (Bonassi et al., 2011). Auch wenn die Bildung der Mikrokerne während der Mitose erfolgt, kann die eigentliche chromosomale Schädigung vor oder während der Mitose stattfinden. Durch DNA-reaktive, genotoxische Kanzerogene, wie zum Beispiel ionisierende Strahlung, bilden sich in der Basalschicht der Mundschleimhautzellen Mikrokerne. Während ihrer Differenzierung wandern die Zellen in das Stratum superficiale, wo man mit Hilfe eines Abstrichs Zellproben entnehmen kann. Da dieser Prozess ungefähr sieben bis 21 Tage benötigt, können Expositionen mit Kanzerogenen erst nach einiger Zeit mit Hilfe des Mikrokerntests nachgewiesen werden (Thomas et al., 2009). Sein Anwendungsgebiet ist daher vor allem beim Nachweis von aktuellen oder chronischen Expositionen zu sehen.

Über den weiteren Verbleib mikrokernhaltiger Zellen gibt es verschiedene Theorien. So besteht die Möglichkeit, dass entweder der Mikrokern aus der Zelle ausgeworfen wird, er wieder in den Zellkern integriert wird, der Mikrokern abgebaut wird, er in der Zelle verbleibt oder über Apoptose die mikrokernhaltige Zelle untergeht (Hintzsche et al., 2018).

Neben der Anwesenheit von Mikrokerneln (*Micronucleated Cells*) können auch andere nukleare Anomalien in den Zellen beobachtet werden (Abb. 5). Ihr genauer Ursprung ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

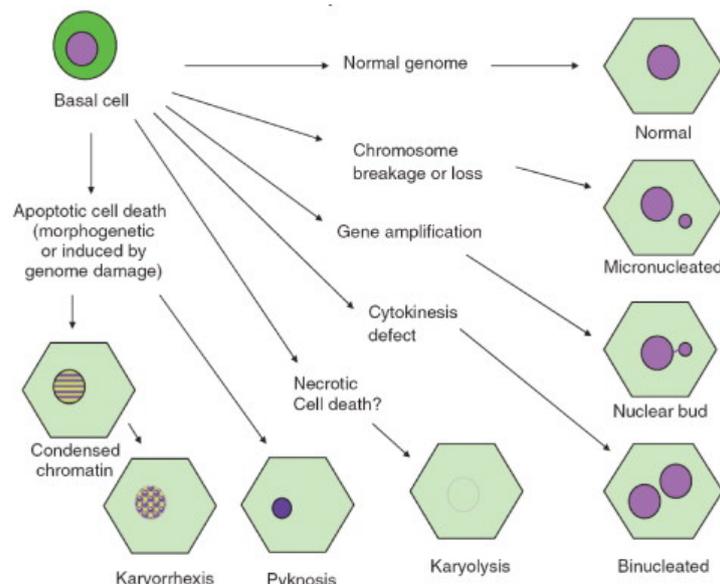


Abb. 5: Schematische Darstellung der Entstehung nuklearer Anomalien (Thomas et al., 2009); mit Genehmigung des Verlages

Zu diesen nuklearen Anomalien gehören zum Beispiel doppelkernige Zellen (*Binucleated Cells*), welche wahrscheinlich durch eine fehlerhafte Zytokinese entstehen. Einige Zelltypen bringt man mit verschiedenen Zeitpunkten des Zelluntergangs in Verbindung. Bei kondensiertem Chromatin (*Condensed Chromatin*) geht man davon aus, dass es in einer frühen Phase der Apoptose auftritt, während man bei einer Fragmentierung des Zellkerns (*Karyorrhexis*) eine Endphase der Apoptose annimmt. In karyolytischen Zellen (*Karyolysis*) ist keine DNA mehr vorhanden und es handelt sich wahrscheinlich um eine sehr späte Phase der Apoptose bzw. Nekrose. Pyknotische Zellen (*Pyknosis*) durchlaufen vermutlich eine spezielle Art des Zelltodes und stehen in Zusammenhang mit der Differenzierung und Reifung von Epithelzellen. Kernknospen (*Nuclear buds*) sind mikrokernähnliche Fragmente, welche mit dem Zellkern verbunden sind. Man nimmt an, dass es sich dabei um überschüssig gebildete DNA handelt (Thomas et al., 2009; Torres-Bugarin et al., 2014).

### **1.3 Mikrokernbildung im Zusammenhang mit Radiotherapie**

Die Studie von Stich et al. im Jahr 1983 war die Erste, welche sich mit dem Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Mikrokernanzahl in Mundschleimhautzellen befasste. Das Ziel war, die Adaptation der DNA-Reparaturmöglichkeiten auf verschiedene exogene Einflüsse in menschlichen Zellen dazustellen. Nach Ansicht der Autoren sind viele Bioassays dafür nicht optimal geeignet, da dabei Zellen herangezogen werden, welche nicht für die Entstehung der Mehrheit der Tumore verantwortlich sind. Sie befürworten den Mikrokerntest, da dieser an Epithelzellen angewendet werden kann, dem Ursprungsgewebe der meisten Tumore und damit ein geeignetes Verfahren zur Darstellung von Genomschädigung auf die menschliche Zelle durch exogene Einflüsse ist. Es wurden die Mundschleimhautzellen eines Patienten, welcher im Kopfbereich mit einer Gesamtdosis von 34 Gy bestrahlt wurde, über einen Zeitraum von dreieinhalb Wochen untersucht. Es wurden insgesamt vier Proben entnommen. Dabei konnte gezeigt werden, dass es im Laufe der Behandlung zu einer Steigerung der Mikrokernrate kommt. Außerdem wurden sieben Patienten nach abgeschlossener Strahlentherapie mit einer Gesamtdosis von 50 bis 60 Gy untersucht. Es wurden dafür sechs Proben in einem Zeitraum von

24 Tagen entnommen. Die Mikrokernrate begann nach fünf bis sieben Tagen zu sinken bis sie am Ende wieder im Normalbereich war.

In der Arbeit von Sarto et al. (1987) wurde die Mikrokernbildung an Mundschleimhautzellen untersucht, um genauer zu differenzieren unter welchen Einflüssen Mikrokerne aus ganzen Chromosomen oder Chromosomenfragmenten entstehen. Dabei haben sie sich unter anderem mit der Entstehung von Mikrokernen im Zusammenhang mit ionisierender Strahlung beschäftigt. Dazu beobachteten sie zwei Patienten, welche sich aufgrund eines Tumors im Kopf-Hals-Bereich einer Strahlentherapie mit einer Einzeldosis von 2 Gy für fünf Tage die Woche unterzogen haben. Die Untersuchung musste aufgrund von einer Mukositis nach Tag 15 bzw. Tag 18 beendet werden. Sie konnten aber dennoch einen linearen Anstieg der Mikrokernrate mit der kumulativen Dosis nachweisen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es ab einer Gesamtdosis von 22 Gy zu einer Absenkung der Anzahl der Mikrokerne kam und dass nach sieben bis 12 Tagen die Mikrokernraten nach Bestrahlungsende wieder im Normbereich lagen. Laut ihrer Studie werden Mikrokerne durch ionisierende Strahlung vorwiegend durch Chromosomenbruch gebildet.

Der Ansatz für die Studie von Tolbert et al. (1992) war ein anderer. Sie wollten eine Validierung des Mikrokerntests an Mundschleimhautzellen erreichen, indem die Auswertungskriterien genauer definiert werden. Diese Arbeit war auch die erste, welche die Bedeutung des Erfassens von nuklearen Anomalien aufzeigte. In der Arbeit wurde zusätzlich zu den Mikrokernen zwischen doppelkernigen Zellen, *Broken Eggs*, Pyknose, kondensiertem Chromatin, fragmentierten Zellkernen und Karyolyse unterschieden. Es ist wichtig, diese zu differenzieren, um eine genaue Abgrenzung zu den Mikrokernen zu erreichen und somit falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Dadurch ist eine Unterscheidung zwischen genom-schädigenden und zytotoxischen Einflüssen möglich. Um dies darzustellen wurden fünf Patienten untersucht, welche eine Strahlentherapie mit einer kumulativen Dosis von ca. 10 Gy innerhalb der letzten drei Wochen erhalten haben. Es wurde jeweils nur eine Probe pro Patient entnommen. Eine Probe war jedoch nicht verwertbar. Es konnte bei allen vier Patienten eine erhöhte Mikrokernrate im Vergleich zu den Negativkontrollen nachgewiesen werden.

Moore et al. (1996) haben durch eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und der damit sequenzspezifischen Färbung die Präzision des Mikrokerntests an Mundschleimhautzellen verbessert, um dadurch eine deutlichere Abgrenzung zwischen den verschiedenen Phänomenen möglich zu machen. Sie haben dafür einen Patienten während einer neunwöchigen Strahlentherapie mit einer Gesamtdosis von 64 Gy vor der Behandlung, während der dritten und sechsten Woche der Therapie sowie nach der Behandlung untersucht. Sie konnten einen Anstieg der Mikrokernrate während der Behandlung feststellen und außerdem beobachten, dass drei Wochen nach abgeschlossener Behandlung die Werte wieder unter dem Ausgangswert lagen. Aufgrund der sequenzspezifischen Färbung konnte wie schon bei Sarto et al. (1987) gezeigt werden, dass durch die ionisierende Strahlung die Mikrokernkerne vorwiegend durch klastogene Schäden entstehen.

Zur Bestimmung der Sensitivität verschiedener Testsysteme zur Darstellung von Genomschädigungen haben Cao et al. (2002) Proben von neun Patienten untersucht, welche sich aufgrund eines nasopharyngealen Karzinoms einer siebenwöchigen Radiotherapie unterzogen haben. Die Proben vor Beginn der Behandlung wurden als Negativkontrolle verwendet und weitere Proben wurden nach kumulativen Dosen von 4, 10, 28, 48 und 68 Gy entnommen. Sie konnten dabei einen Anstieg der Mikrokernrate feststellen, wobei es ab einer kumulativen Dosis von 28 Gy nur noch zu einem unmerklichen Anstieg kam. Bezüglich der unterschiedlichen Testsysteme haben sie festgestellt, dass Verfahren wie der „*Cytokinesis-Block Micronucleus Test*“ der beste Nachweis zur Darstellung von Genomschädigung ist. Da dieses Verfahren jedoch sehr aufwendig ist, stellt der Mikrokerntest an Mundschleimhautzellen eine gute Alternative dar.

Die Arbeit von Bindu et al. (2003) beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob es aufgrund von zellulären Veränderungen während einer Bestrahlung möglich ist, eine Prognose über ein eventuelles Rezidiv zu stellen. Dafür wurden bei 68 Patienten, welche an einem Tumor in der Mundhöhle erkrankt sind, Mundschleimhautproben vor Beginn der Behandlung und vier Proben während einer dreiwöchigen Strahlentherapie entnommen. Die Patienten erhielten eine Gesamtdosis von 52,5 Gy in 15 Fraktionen im Rahmen einer akzelerierten Bestrahlung. Es konnte dabei ebenfalls ein Anstieg der Mikrokernrate gezeigt

werden, welche ab einer kumulativen Dosis von 28 Gy nur noch geringfügig gestiegen ist. Nach der Behandlung wurden die Patienten bezüglich eines möglichen Rezidivs für mindestens 18 Monate weiterverfolgt. Sie konnten dabei einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Mikrokernrate und einer verringerten Rezidivrate feststellen. Tumore mit höheren Mikrokernraten reagierten strahlensensibler und hatten damit eine bessere Prognose.

Die unterschiedliche Wirkung von ionisierender Strahlung auf Mundschleimhautzellen und Lymphozyten untersuchten Minicucci et al. (2005). Sie schlossen dabei 26 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren ein, welche eine Gesamtdosis von 45 bis 70,4 Gy innerhalb einer fünf- bis siebenwöchigen Behandlung erhalten haben. Es gab insgesamt drei Zeitpunkte der Probenentnahme: vor, während und nach abgeschlossener Behandlung. Es konnte dabei gezeigt werden, dass es zu einem geringen Anstieg der Mikrokernrate in Mundschleimhautzellen während der Behandlung kam, welcher nach abgeschlossener Behandlung wieder gesunken ist. Bei den Lymphozyten hingegen konnte ein deutlich stärkerer Anstieg während der Behandlung festgestellt werden, welcher auch nach abgeschlossener Behandlung leicht gestiegen ist.

Tak et al. (2014) haben die Mikrokernrate bei Patienten mit Tumoren in der Mundhöhle untersucht, indem sie die Mundschleimhautzellen der Wange gegenüber der Läsion entnommen haben. Es lagen insgesamt 30 Proben von verschiedenen Patienten vor, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Therapie entnommen wurden. Sie konnten, obwohl die Mundschleimhautzellen nicht direkt am Tumor entnommen wurden, eine erhöhte Mikrokernrate im Vergleich zu den Negativkontrollen feststellen. Es konnte ebenfalls ein Anstieg der Mikrokernrate durch ionisierende Strahlung gezeigt werden, jedoch konnten sie im Vergleich zu den voran erwähnten Studien keinen Zusammenhang zur Strahlendosis feststellen.

## 2 Zielsetzung

Dass ionisierende Strahlung zu Veränderungen in der menschlichen DNA führt, ist bereits bekannt (Dizdaroglu, 1992). Da mikrokernhaltige Zellen aufgrund ihrer aneugenen oder klastogenen Schädigung ein Anzeichen genomischer Instabilität sind, dient der Mikrokerntest als Nachweis exogener Einflüsse auf das Genom. Wie bereits gezeigt, wurden bereits verschiedene Arbeiten veröffentlicht, welche sich mit dem Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Mikrokernanzahl in Mundschleimhautzellen befassen haben. Jedoch wurden in diesen Studien entweder nur geringe Patientenzahlen berücksichtigt, nur wenige Proben während der Behandlung oder keine Proben nach Abschluss der Behandlung entnommen. In dieser Arbeit wurden daher Proben von insgesamt 25 Patienten vor Beginn der Behandlung sowie in der 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche entnommen. Bei diesen sowie bei neun weiteren Patienten wurden neun bis 12 Wochen nach Behandlungsbeginn ebenfalls Proben entnommen. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Untersuchung der Mikrokernrate in Mundschleimhautzellen von Patienten mit malignen Kopf-Hals-Tumoren während einer sechswöchigen Strahlentherapie. Es soll geklärt werden, ob es durch ionisierende Strahlung zu einer Veränderung der Mikrokernrate kommt und wenn ja, ab welchem Zeitpunkt diese erkennbar ist und wie sich die Anzahl der Mikrokerne über die Behandlungszeit verändert. Auch soll die Frage geklärt werden, ob die Mikrokernanzahl einige Woche nach abgeschlossener Strahlentherapie wieder sinkt oder ob es durch ionisierende Strahlung zu dauerhaften Veränderungen im Genom kommt. Da maligne Tumore durch genetische Mutationen entstehen und Mikrokerne eine Chromosomenmutation darstellen, soll die Frage geklärt werden, ob Patienten mit malignen Kopf-Hals-Tumoren generell eine erhöhte Mikrokernanzahl im Vergleich zu nicht erkrankten Probanden aufweisen. Ebenfalls soll untersucht werden, ob eine zusätzliche Kombination mit einer Chemotherapie, das Geschlecht und das Alter der Patienten sowie auch das Grading und T-Stadium des Tumors einen Einfluss auf die Anzahl der Mikrokerne haben.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Probandenkollektiv**

Es liegt eine Genehmigung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg (Nr. 203/08) vor. Die Patienten haben freiwillig an der Studie teilgenommen und wurden sowohl mündlich als auch schriftlich über die Studie aufgeklärt. Die schriftlichen Einverständniserklärungen der Patienten liegen vor.

#### **3.1.1 Tumorpatienten**

Das Probandenkollektiv bestand aus 35 Patienten der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg. Diese wurden alle aufgrund von histologisch nachgewiesenen malignen Tumoren mit verschiedenen Ausprägungsgraden im Bereich des Kopfes und Halses behandelt. Dabei handelte es sich bei allen Patienten um eine postoperative adjuvante Therapie. Die häufigste Ursache für eine Radio-/Radiochemotherapie war ein Tumor im Bereich der Mundhöhle (17 Patienten), gefolgt von Tumoren im Bereich des Pharynx (sechs Patienten) sowie Tonsillen- (vier Patienten) und Larynxkarzinomen (zwei Patienten). Die fünf restlichen Patienten wiesen Neoplasien in anderen Bereichen des Kopfes und Halses auf.

Im Zeitraum von 03/2010 bis 07/2011 wurden den Patienten in bestimmten Abständen mithilfe eines Wattestäbchens Mundschleimhautabstriche entnommen. Es gab insgesamt fünf Zeitpunkte der Probenentnahmen: vor der ersten Bestrahlung (Woche 0), in der 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche und in der 9. bis 12. Woche ab Behandlungsbeginn in der Phase der Nachsorge.

Da ein Patient schon vor Beginn der Behandlung einen sehr hohen Ausgangswert an Mikrokernen (MK) aufwies ( $> 100$  MK/1000 Zellen), wurde dieser aus der Studie ausgeschlossen. Der Patient wies einen Tumor im Bereich der Wangen und Lippen auf, so dass es wahrscheinlich nicht möglich war eine Probe von einer intakten Mundschleimhaut zu erhalten. Von 25

Patienten wurden in den oben genannten Abständen Proben entnommen. Davon erhielten 12 Patienten eine alleinige Radiotherapie, 13 wurden noch zusätzlich mit einer Chemotherapie behandelt. Aufgrund der teilweise mangelnden Compliance der Patienten oder wegen des Wunsches, die Nachsorge in einer niedergelassenen Praxis durchführen zu lassen, gab es für den Zeitpunkt der letzten Probenentnahme nach Behandlungsabschluss nur wenige Proben. Daher wurden bei neun Patienten in der Phase der Nachsorge nur jeweils eine Probe entnommen. Bei diesen Patienten lagen die gleichen Bedingungen wie bei den anderen in dieser Arbeit berücksichtigten Patienten vor. Davon erhielten zwei Patienten eine alleinige Radiotherapie und sieben eine Radiochemotherapie.

Die Patienten wurden mit Einzeldosen von 1,7 bis 2,2 Gy mit 30 bis 33 Fraktionen durch eine intensitätsmodulierte Strahlentherapie behandelt. In der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg kamen im Rahmen dieser Studie fünf unterschiedliche Chemotherapieansätze zur Anwendung: Cisplatin wöchentlich, Cisplatin mono, Cisplatin/5-FU, Cisplatin/Cetuximab und Cetuximab/Cisplatin/5-FU. Der detaillierte Ablauf der verschiedenen Chemotherapiezyklen ist im Anhang unter 8.1 Chemotherapieansätze in den Tabellen 1 bis 5 zu finden.

Es wurde neben dem genauen Therapieverfahren, das Alter und Geschlecht sowie die Lokalisation, das T-Stadium und das Grading des Tumors für jeden Patienten erfasst. Die Daten sind im Anhang unter 8.2 Auswertungsergebnisse in Tabelle 6 zu finden. Die Einteilung der Tumorgöße erfolgte nach der TNM-Klassifikation für Tumore der Lippen, Mundhöhle sowie Hypo- und Oropharynx (Brierley et al., 2017):

Tis	Carcinoma in situ
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor < 2 cm
T2	Tumor 2 bis 4 cm
T3	Tumor erreicht Organgrenze oder > 4 cm
T4	Tumor bricht in Nachbarorgan oder benachbarte Strukturen ein
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden

Die Grading-Einteilung erfolgte nach folgender Einteilung:

G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert

### **3.1.2 Negativkontrollen**

Es wurden insgesamt zehn Probanden als Negativkontrollen verwendet. Dabei handelte es sich um Erwachsene aus dem Bekanntenkreis der Autorin, welche freiwillig an dieser Studie teilgenommen haben. Voraussetzung war, dass die Probanden weder zu dem Zeitpunkt der Probenentnahme noch davor eine Bestrahlungs- und/oder Chemotherapie erhalten haben und nicht an einem Tumor im Kopf-Hals-Bereich erkrankt sind.

Fünf der zehn Probanden haben die Proben im selben Rhythmus wie die Tumorpatienten (Woche 0, 2, 4, 6, 9-12) abgegeben. Bei den weiteren fünf Probanden wurde nur eine einmalige Probe entnommen.

Das Alter der Probanden lag zwischen 21 und 38 Jahren und betrug im Durchschnitt 32 Jahre. Es haben fünf Frauen und fünf Männer an der Studie teilgenommen. Die einzelnen Daten sind im Anhang unter 8.2 Auswertungsergebnisse in Tabelle 7 zu finden.

## **3.2 Materialien**

Eine genaue Auflistung der verwendeten Materialien, Chemikalien, Geräte sowie angesetzter Lösungen ist im Anhang unter 8.3 Verwendete Materialien in den Tabellen 9 bis 11 zu finden.

### **3.3 Methoden**

#### **3.3.1 Herstellung der Präparate**

Es wurden 101 Proben der Tumorpatienten von Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsklinik Würzburg sowie neun Proben durch die Autorin entnommen. Die insgesamt 30 Proben der Negativkontrollen wurden ausschließlich durch die Autorin entnommen. Dabei wurden mit leichtem Druck mithilfe eines Wattestäbchens viermal jeweils in jeder Wangeninnenseite durch rollende Bewegungen Mundschleimhautzellen (MSH-Zellen) aufgenommen. Die von beiden Wangen entnommenen Zellen wurden als eine Probe aufbereitet und ausgewertet.

Da die Aufbereitung der Mundschleimhautzellen kurz nach der Entnahme erfolgen musste, wurden 76 Proben durch technische Assistenten der Arbeitsgruppe von Frau Professor Stopper des Instituts für Toxikologie der Universität Würzburg sowie 64 durch die Autorin selber aufbereitet. Dafür wurden die Wattestäbchen mit den MSH-Zellen in ein Falconröhrchen mit 4 ml NaCl (0,9 %) getaucht und damit von dem Wattestäbchen gelöst. Die so entnommenen Mundschleimhautzellen wurden mehrmals mit einem MSH-Puffer gewaschen. Dazu wurden 10 ml MSH-Puffer zu den Zellen gegeben und diese fünf Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 0,5 bis 1,0 ml abpipettiert. Nun wurden 5 ml MSH-Puffer hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand bis auf Restvolumen von 0,5 bis 1,0 ml verworfen. Dieser Vorgang des Waschens wurde dreimal wiederholt. Die Zellen wurden anschließend in 1,0 bis 1,5 ml MSH-Puffer resuspendiert. Mit Hilfe des Casy-Counters wurde die Zellzahl bestimmt. Durch die Cytospinpräparation wurden pro Probe sechs Objektträger mit jeweils 8000 Zellen hergestellt. Die Präparate wurden in Methanol bei -20 °C für mindestens eine Stunde fixiert und anschließend verblindet.

### 3.3.2 Färbung der Präparate

In einer vorangegangenen Studie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg hat die Färbung mit dem Antikörper anti- $\alpha$ -Tubulin und mit Chromomycin A<sub>3</sub> im Zusammenhang mit dem Mikrokerntest für Mundschleimhautzellen gute Ergebnisse erzielt und wurde daher auch für diese Arbeit verwendet (Hintzsche und Stopper, 2010). Die Färbung der 140 Präparate erfolgte ausschließlich durch die Autorin. Sobald die Präparate nach der Entnahme aus dem Methanol getrocknet waren, wurde 15  $\mu$ l der Tubulingebrauchslösung auf die Zellen gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Die Präparate wurden nun für eine Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Abspülen der Färbelösung mit destilliertem H<sub>2</sub>O wurden die Zellen mit 15  $\mu$ l der Chromomycinlösung bedeckt und erneut mit einem Deckglas geschützt. Nach drei Minuten Einwirkzeit wurden die Lösung und das Deckglas mit destilliertem H<sub>2</sub>O abgespült. Nachdem die Objektträger getrocknet waren, wurden die Zellen mit 15  $\mu$ l DABCO eingedeckt und mit einem Deckglas bedeckt. Die gefärbten Präparate sind verschlossen bei 4 °C einige Monate haltbar.

### 3.3.3 Mikrokerntest

Die Auswertung erfolgte am Mikroskop unter 40-facher Vergrößerung. Bei Verwendung einer anti- $\alpha$ -Tubulin/Chromomycin A<sub>3</sub> Färbung in Kombination mit einem FITC-Filter fluoreszieren das Zytoplasma der Zelle grün und der Zellkern gelb. Die Auswertung der 140 Präparate erfolgte ausschließlich durch die Autorin. Pro Probe eines Patienten wurden jeweils zwei Objektträger ausgewertet. Bei jedem Präparat wurden je 1000 Zellen gezählt. Dabei wurde der Objektträger systematisch in Bahnen von oben nach unten durchgearbeitet. Unterschieden wurde zwischen einkernigen Zellen, doppelkernigen Zellen, kondensiertem Chromatin, fragmentierten Kernen, Pyknose, Karyolyse, einem Mikrokern pro Zelle, zwei Mikrokernen pro Zelle, mehr als zwei Mikrokernen pro Zelle und Sonstiges. Kernknospen wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Der Anteil der mikrokernhaltigen Zellen/1000 Mundschleimhautzellen wird in der

weiteren Arbeit in Promille (‰) angegeben. Die einzelnen Ergebnisse sind im Anhang unter 8.2 Auswertungsergebnisse in den Tabellen 7 und 8 zu finden.

Die Kriterien zur Beurteilung der Zellen waren folgende (Tolbert et al., 1992; Thomas et al., 2009):

Es wurden nur Zellen gewertet, bei denen ein Zellkern sicher seiner Zelle zugeordnet werden konnte. Das bedeutet, dass Zellanhäufungen oder Überlappungen, wie sie häufig durch das Zentrifugieren entstehen, nicht berücksichtigt wurden. Das Zytoplasma und der Zellkern sollten intakt und die Zellen verhältnismäßig flach auf dem Präparat fixiert sein. Die Zellen sollten annähernd rein von Verschmutzungen und Fremdkörpern sein.

Ein Mikrokern sollte minimal 1/16 bis maximal 1/3 der Größe des Zellkerns entsprechen. Er sollte sich im Zytoplasma der Zelle befinden und eine runde bis ovale Form aufweisen. Weitere wichtige Kriterien sind, dass der Mikrokern die gleiche Farbintensität und Struktur wie der Zellkern zeigt sowie eine scharfe Abgrenzung aufweist (Abb. 6a und b). Einkernige Zellen besitzen einen ovalen bis runden Zellkern und einen hohen Zytoplasmaanteil, während doppelkernige Zellen zwei Zellkerne der gleichen Größe und Farbintensität aufweisen. Häufig liegen die Zellkerne sehr nah aneinander oder berühren sich (Abb. 6c). Bei kondensiertem Chromatin ist in einigen Bereichen das Chromatin verdichtet. An den verdichteten Stellen wird mehr Farbstoff eingelagert und der Zellkern wirkt dadurch gestreift (Abb. 6d). Bei der destruktiven Fragmentierung des Zellkerns und der damit verbundenen Verdichtung des Chromatins entsteht eine bläschenartige Struktur (Abb. 6e). Ist der Zellkern stark geschrumpft, spricht man von Pyknose. Der Durchmesser des Kerns beträgt nur noch 1/3 bis 2/3 des ursprünglichen Zellkerns. Durch die Verdichtung des Chromatins ist der Kern stark gefärbt (Abb. 6f). Bei karyolytischen Zellen löst sich der Zellkern durch Abbau der DNA auf. Dadurch, dass weniger DNA angefärbt werden kann, erscheint der Zellkern heller und man sieht nur einen Schatten des Kerns (Abb. 6g).

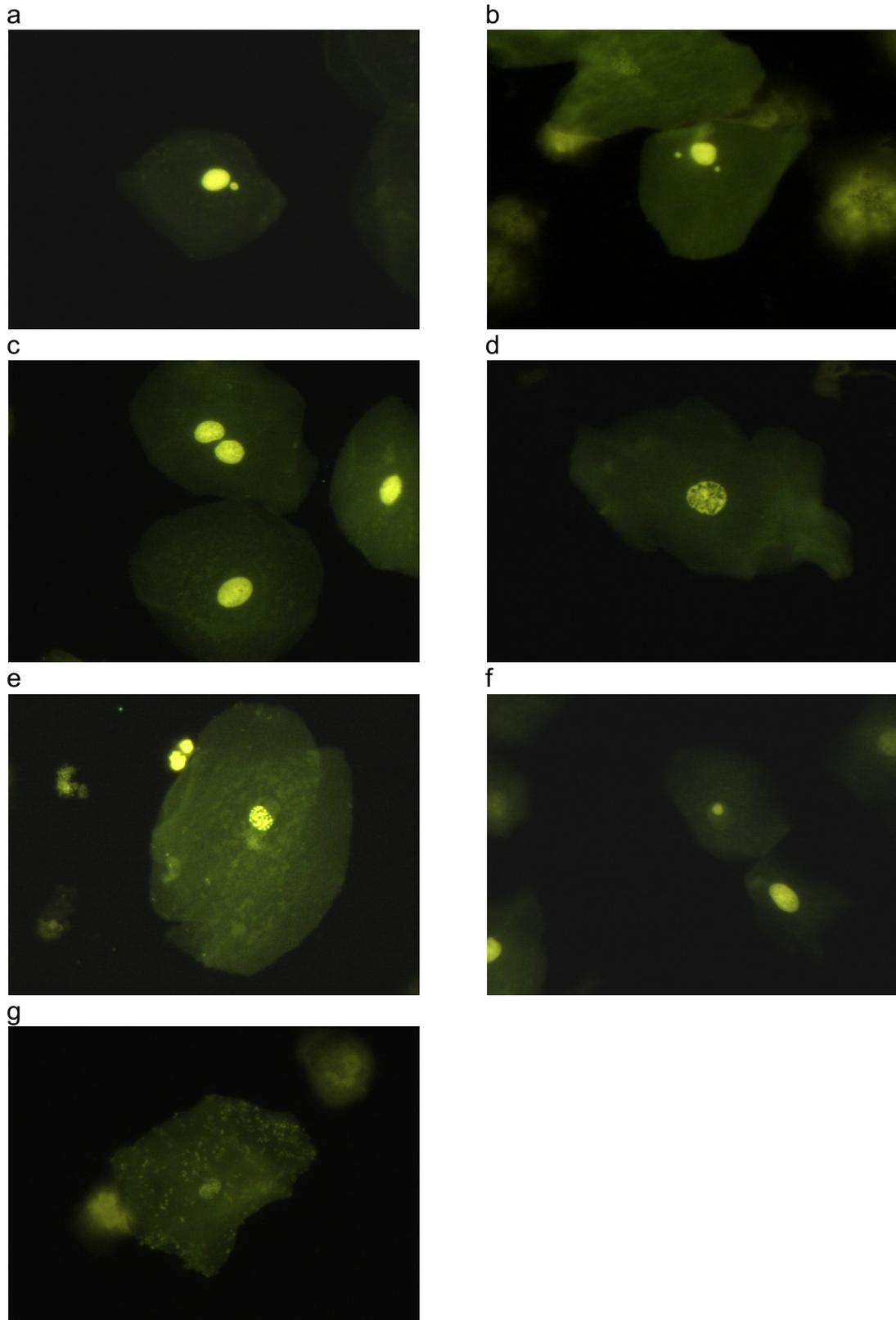


Abb. 6: Zellaufnahmen mit einer anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper/Chromomycin A<sub>3</sub> Färbung unter 40-facher Vergrößerung: (a) 1 MK/Zelle (b) 2 MK/Zelle (c) doppelkernige und einkernige Zelle (d) kondensiertes Chromatin (e) fragmentierter Zellkern (f) Pyknose (g) Karyolyse

### **3.4 Statistik**

Zur statistischen Auswertung wurde die Software SPSS verwendet. Es wurden sowohl der Mittelwert als auch der Standardfehler für die Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen/1000 Mundschleimhautzellen berechnet. Um zu prüfen, ob sich die Mittelwerte zu den einzelnen Zeitpunkten signifikant unterscheiden, wurde für die statistische Auswertung der Wilcoxon-Test angewendet. Zur Untersuchung der unterschiedlichen Patientengruppen sowie der Faktoren Alter, Geschlecht, Grading und T-Stadium wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Der Signifikanzwert war  $p < 0,05$ . Die statistische Auswertung erfolgte durch die Autorin.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Probandenkollektiv

Das Alter der 34 Tumorpatienten lag zwischen 21 und 79 Jahren und betrug im Durchschnitt 60 Jahre. Es gab keinen Altersunterschied zwischen Patienten mit und ohne zusätzliche Chemotherapie. Sowohl Patienten mit Radiotherapie als auch Patienten mit Radiochemotherapie waren im Durchschnitt 60 Jahre alt. Männliche Patienten waren zu Behandlungsbeginn 60 Jahre alt und Patientinnen 59 Jahre.

An der Studie haben mehr Männer als Frauen teilgenommen. So lagen 23 der insgesamt 34 Proben von Männern vor. Von ihnen haben 12 Patienten eine Radiotherapie und 11 Patienten eine Radiochemotherapie erhalten. Des Weiteren lagen 11 Proben von Frauen vor, von denen zwei mit einer Radiotherapie und neun mit einer Radiochemotherapie behandelt wurden.

Im Bezug auf die Tumorgöße lag bei neun Patienten ein T1-Stadium, bei acht Patienten ein T2-Stadium, bei fünf Patienten ein T3-Stadium und bei 11 Patienten ein T4-Stadium vor. Bei einem Patienten konnte der Primärtumor nicht beurteilt werden.

Die Tumore von fünf Patienten waren gut differenziert (G1), von 18 Patienten mässig differenziert (G2) und bei zehn Patienten schlecht differenziert (G3). Bei einem Patienten lagen keine Angaben zum Grading vor.

## 4.2 Vergleich der Mikrokernraten der Wochen 0 bis 6

Zur Darstellung der Veränderung der Mikrokernrate während der sechswöchigen Strahlentherapie wurden im Folgenden die Mikrokernraten zu den verschiedenen Zeitpunkten der Wochen 0 bis 6 miteinander verglichen und in Abbildung 7 veranschaulicht. In diesem Vergleich wurden die Patienten mit Radiotherapie und Radiochemotherapie zusammengefasst. Von 17 Patienten lag jeweils eine vollständige Anzahl von Proben zu den Zeitpunkten vor Behandlungsbeginn sowie in der 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche vor.

Während der gesamten Behandlung konnte ein Anstieg der Mikrokernanzahl beobachtet werden. Den größten Anstieg konnte man zwischen Woche 0 und Woche 2 feststellen, in den weiteren Wochen wurde der Anstieg immer geringer. Vor Beginn der Behandlung (Woche 0) lag die Mikrokernanzahl bei 5,4 ‰ und ist dann signifikant auf 35,1 ‰ in Woche 2 angestiegen. Die Mikrokernanzahl stieg von Woche 2 zu Woche 4 ebenfalls signifikant auf 49,3 ‰ und von Woche 4 zu Woche 6 auf 51,1 ‰ ohne Signifikanz. Es konnte bei Woche 2, 4 und 6 eine Signifikanz zu Woche 0 festgestellt werden.

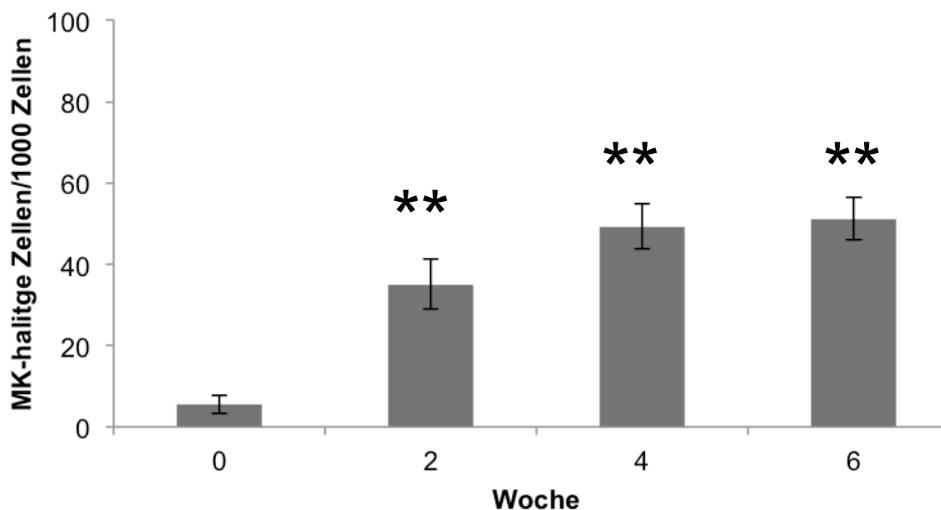


Abb. 7: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche; dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, \*  $p < 0,05$  oder \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu Woche 0

Des Weiteren wurde die Veränderung der Mikrokernrate bei den unterschiedlichen Patientengruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten der Wochen 0 bis 6 untersucht. Die Ergebnisse wurden für die Gruppen Radiotherapie, Radiochemotherapie und Negativkontrollen in Abbildung 8 veranschaulicht. Für die Auswertung wurde ebenfalls jeder Zeitpunkt der jeweiligen Patientengruppe miteinander verglichen. Von fünf Probanden der Negativkontrollen, neun Patienten, welche eine Radiotherapie erhalten haben und von acht Patienten, welche mit einer Radiochemotherapie behandelt wurden, lagen Proben zu den Zeitpunkten Woche 0 bis Woche 6 vor.

Für die Negativkontrollen konnte während des gesamten Zeitraums kein signifikanter Anstieg der Mikrokernanzahl beobachtet werden. Die Werte lagen von Woche 0 bis Woche 6 zwischen 1,1 ‰ und 2,2 ‰.

Schon vor Beginn der Behandlung lagen die Werte der Patienten mit einer Radiotherapie über denen der Negativkontrollen. Während der gesamten Behandlung konnte ein Anstieg Mikrokernanzahl beobachtet werden. Den größten Anstieg konnte man zwischen Woche 0 und Woche 2 feststellen, in den weiteren Wochen fand nur noch eine geringe Zunahme statt. Vor Beginn der Behandlung lag die Mikrokernanzahl bei 5,4 ‰ und ist dann signifikant auf 36,7 ‰ in Woche 2 angestiegen. Die Mikrokernanzahl stieg von Woche 2 zu Woche 4 auf 42,4 ‰ und von Woche 4 zu Woche 6 auf 48,9 ‰.

Die Werte der Patienten mit einer Radiochemotherapie lagen ebenfalls vor Beginn der Behandlung über denen der Negativkontrollen. Während der Wochen 0 bis 4 konnte ein Anstieg der Mikrokernanzahl beobachtet werden, welche dann in Woche 4 ein Plateau erreichte. Von Woche 0 bis 2 und Woche 2 bis 4 fand ein annähernd gleichmäßiger Anstieg statt. Vor Beginn der Behandlung lag die Mikrokernanzahl bei 3,3 ‰ und ist dann signifikant auf 29,7 ‰ in Woche 2 angestiegen. Die Mikrokernanzahl stieg von Woche 2 zu Woche 4 auf 53,6 ‰ und blieb ab Woche 4 konstant. Es konnte bei Woche 2, 4 und 6 eine Signifikanz zu Woche 0 für die Gruppen Radiotherapie und Radiochemotherapie festgestellt werden.

## 4 Ergebnisse

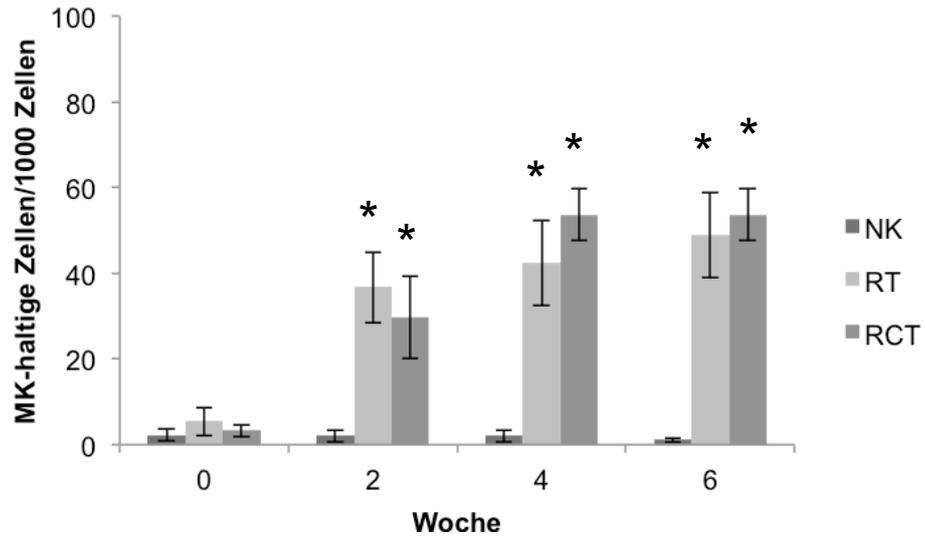


Abb. 8: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche; Ergebnisse für Negativkontrollen (NK), Radiotherapie (RT) und Radiochemotherapie (RCT); dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu Woche 0 derselben Gruppe

### 4.3 Vergleich der Mikrokernraten bei Radio-/Radiochemotherapie zum selben Zeitpunkt

Es wurde ebenfalls untersucht, ob ein Unterschied in der Mikrokernrate der verschiedenen Behandlungsvarianten Radiotherapie und Radiochemotherapie festzustellen war. Dafür wurden die Ergebnisse für beide Gruppen zum selben Zeitpunkt miteinander verglichen und in Abbildung 9 veranschaulicht. Für Woche 0 lagen 12 Proben von Patienten mit Radiotherapie und 13 Proben von Patienten mit Radiochemotherapie vor. Für Woche 2 lagen 11 Proben von Patienten mit Radiotherapie und 12 Proben von Patienten mit Radiochemotherapie vor. Für Woche 4 lagen 12 Proben von Patienten mit Radiotherapie und 11 Proben von Patienten mit Radiochemotherapie vor. Für Woche 6 lagen neun Proben von Patienten mit Radiotherapie und zehn Proben von Patienten mit Radiochemotherapie vor. Für Woche 9 bis 12 lagen fünf Proben von Patienten mit Radiotherapie und 11 Proben von Patienten mit Radiochemotherapie vor.

Patienten mit Radiotherapie hatten im Vergleich zu Patienten mit Radiochemotherapie eine leicht erhöhte Mikrokernanzahl vor Beginn der Behandlung und in Woche 2. Der Ausgangswert für Radiotherapie lag bei 7,0 ‰ und für Radiochemotherapie bei 2,8 ‰. In Woche 2 lagen die Werte für Radiotherapie bei 39,5 ‰ und für Radiochemotherapie bei 30,4 ‰. Patienten mit Radiochemotherapie hatten im Vergleich zu Patienten mit Radiotherapie eine erhöhte Mikrokernanzahl in Woche 4 und Woche 6. Die Werte für Radiotherapie lagen bei 46,4 ‰ und für Radiochemotherapie bei 63,9 ‰ in Woche 4. In Woche 6 lagen die Werte für Radiotherapie bei 48,9 ‰ und für Radiochemotherapie bei 53,6 ‰. Patienten mit Radiotherapie und Patienten mit Radiochemotherapie hatten die gleiche Mikrokernanzahl in Woche 9 bis 12. Die Werte lagen bei 1,7 ‰. Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen festgestellt werden.

## 4 Ergebnisse

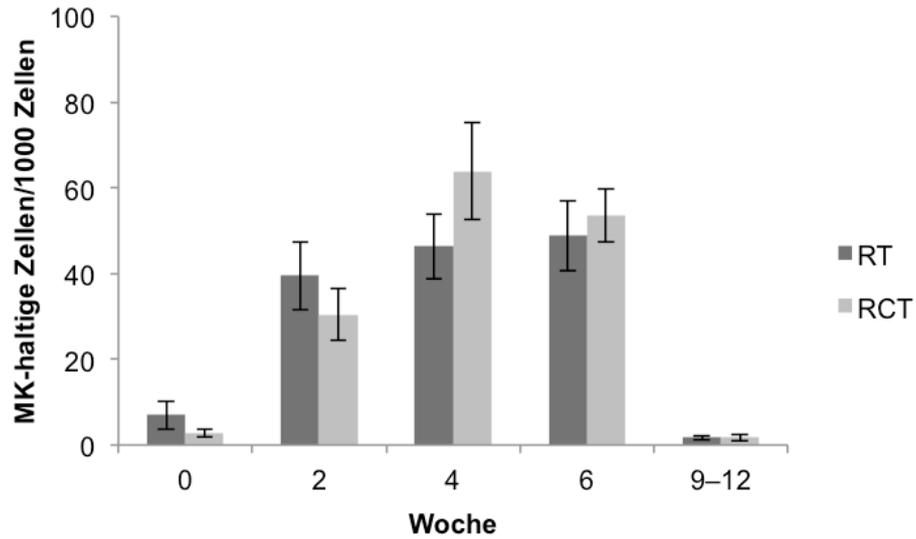


Abb. 9: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche und 9-12 Wochen nach Behandlungsbeginn; Ergebnisse für Radiotherapie (RT) und Radiochemotherapie (RCT); dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $p < 0,05$  im Vergleich RT zu RCT zum selben Zeitpunkt

#### 4.4 Vergleich der Mikrokernraten vor Behandlungsbeginn und nach Behandlungsabschluss

Es wurde verglichen, wie sich die Mikrokernrate vor Behandlungsbeginn und nach Behandlungsabschluss verhält. In diesem Vergleich wurden sowohl die Patienten mit Radiotherapie und Radiochemotherapie zusammengefasst und in Abbildung 10 veranschaulicht. Zu dem Zeitpunkt Woche 0 und für die Wochen 9 bis 12 lagen sieben Proben von den gleichen Patienten vor.

Patienten hatten vor Beginn der Behandlung eine höhere Mikrokernanzahl als nach Abschluss der Behandlung. Die Werte lagen vorher bei 4,9 ‰ und nachher bei 1,7 ‰. Es konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

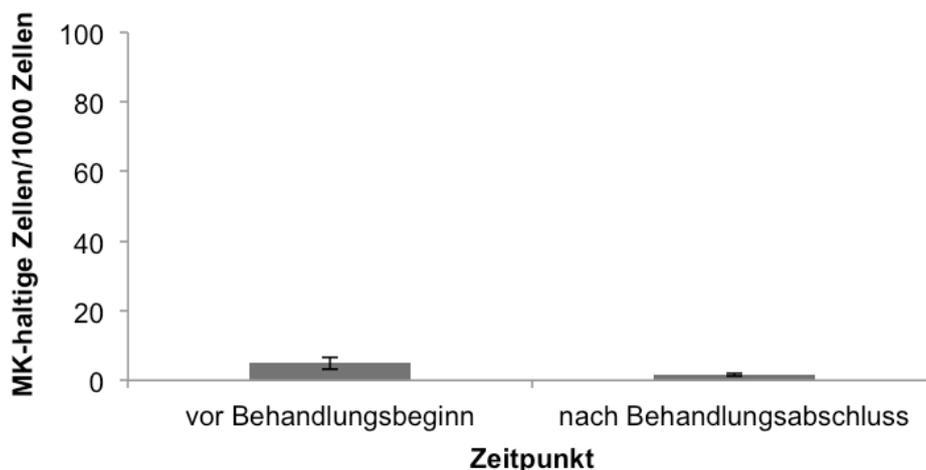


Abb. 10: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten vor Behandlungsbeginn und nach Behandlungsabschluss; dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $p < 0,05$  im Vergleich zueinander

Es wurde ebenfalls verglichen, ob sich die Mikrokernrate bezüglich der unterschiedlichen Patientengruppen vor Behandlungsbeginn und nach Behandlungsabschluss unterscheiden. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse vor Behandlungsbeginn und nach Behandlungsabschluss der jeweiligen Patientengruppen miteinander verglichen. Die Ergebnisse wurden für die Gruppen Radiotherapie, Radiochemotherapie und Negativkontrollen in Abbildung 11 veranschaulicht. Für Woche 0 und für die Wochen 9 bis 12 lagen

fünf Proben für die Gruppe der Negativkontrollen, drei Proben von den gleichen Patienten, welche mit einer Radiotherapie behandelt wurden und vier Proben von den gleichen Patienten, welche mit einer Radiochemotherapie behandelt wurden, vor.

Die Negativkontrollen hatten zu beiden Zeitpunkten eine annähernd gleich hohe Mikrokernanzahl. Die Werte lagen vorher bei 1,8 ‰ und nachher bei 1,6 ‰. Patienten mit alleiniger Radiotherapie scheinen vor Beginn der Behandlung eine höhere Mikrokernanzahl als nach Abschluss der Behandlung zu haben. Die Werte lagen vorher bei 7,6 ‰ und nachher bei 1,7 ‰. Patienten mit Radiochemotherapie hatten vor Beginn der Behandlung eine leicht höhere Mikrokernanzahl als nach Abschluss der Behandlung. Die Werte lagen vorher bei 3,0 ‰ und nachher bei 1,5 ‰. Es konnte vor Behandlungsbeginn und nach Behandlungsabschluss kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Patientengruppen festgestellt werden.

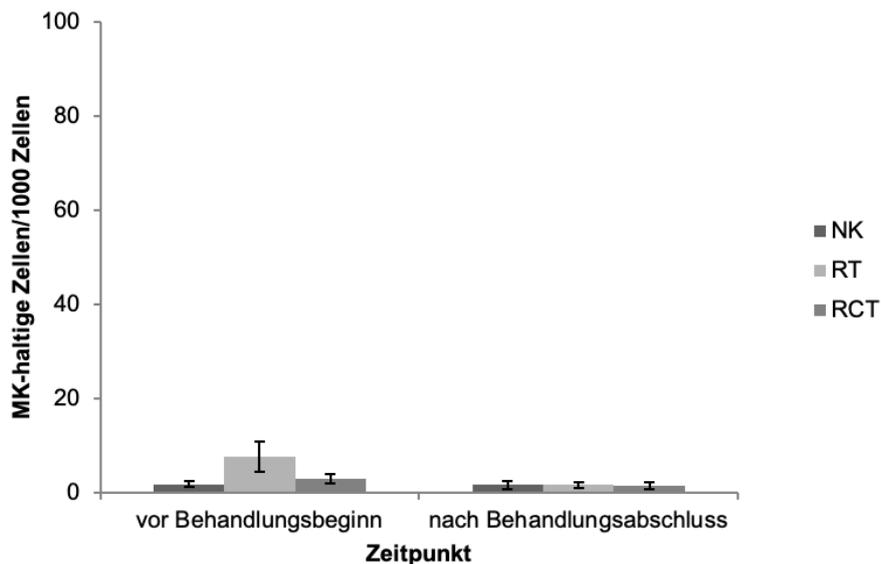


Abb. 11: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten vor Behandlungsbeginn und nach Behandlungsabschluss; Ergebnisse für Negativkontrollen (NK), Radiotherapie (RT) und Radiochemotherapie (RCT); dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $p < 0,05$  im Vergleich vor Behandlungsbeginn und nach Behandlungsabschluss derselben Gruppe

#### 4.5 Vergleich der Mikrokernraten nach Geschlecht

Es wurde untersucht, ob das Geschlecht der Patienten einen Einfluss auf die Mikrokernrate hat. Dafür wurde die Mikrokernanzahl von Männern und Frauen zum selben Zeitpunkt verglichen und in Abbildung 12 veranschaulicht. Für Woche 0 lagen 20 Proben von männlichen Patienten und fünf von weiblichen Patienten vor. Für Woche 2 lagen 18 Proben von Männern und fünf von Frauen vor. Für Woche 4 lagen 18 Proben von männlichen Patienten und fünf von weiblichen Patienten vor. Für Woche 6 lagen 16 Proben von Männern und drei von Frauen vor. Für Woche 9 bis 12 lagen neun Proben von männlichen Patienten und sieben von weiblichen Patienten vor.

Die Mikrokernanzahl wies zum Zeitpunkt Woche 0 und Woche 2 ähnliche Werte auf. Sie betrug für Männer 5 ‰ und für Frauen 4,5 ‰ in Woche 0 und in Woche 2 für Männer 35 ‰ und für Frauen 33,5 ‰. Die Mikrokernanzahl wies in Woche 4 einen erhöhten Wert bei den Frauen auf. Sie lag für Männer bei 55,8 ‰ und für Frauen bei 62,7 ‰. In Woche 6 und Woche 9 bis 12 wies die Mikrokernanzahl erneut ähnliche Werte auf. Sie betrug für Männer 51,4 ‰ und für Frauen 51,3 ‰ in Woche 6 sowie in Woche 9 bis 12 für Männer 1,7 ‰ und für Frauen 1,3 ‰. Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die Mikrokernrate festgestellt werden.

#### 4 Ergebnisse

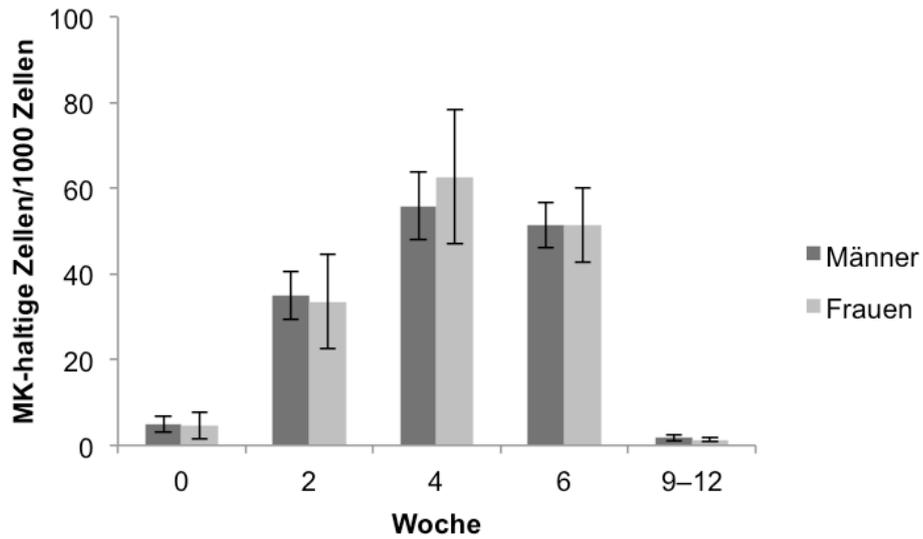


Abb. 12: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche und 9-12 Wochen nach Behandlungsbeginn; Ergebnisse für Männer und Frauen; dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $p < 0,05$  im Vergleich Männer zu Frauen zum selben Zeitpunkt

## 4.6 Vergleich der Mikrokernraten nach Alter

Es wurde untersucht, ob das Alter der Patienten einen Einfluss auf die Mikrokernrate hat. Dafür wurde die Mikrokernanzahl von Patienten  $> 60$  Jahre und  $\leq 60$  Jahre zum selben Zeitpunkt verglichen und in Abbildung 13 veranschaulicht. Für Woche 0 lagen 12 Proben von Patienten  $> 60$  Jahre und 13 Proben von Patienten  $\leq 60$  Jahre vor. Für Woche 2 lagen 11 Proben von Patienten  $> 60$  Jahre und 12 Proben von Patienten  $\leq 60$  Jahre vor. Für Woche 4 lagen 11 Proben von Patienten  $> 60$  Jahre und 12 Proben von Patienten  $\leq 60$  Jahre vor. Für Woche 6 lagen 12 Proben von Patienten  $> 60$  Jahre und sieben Proben von Patienten  $\leq 60$  Jahre vor. Für Woche 9 bis 12 lagen zehn Proben von Patienten  $> 60$  Jahre und sechs Proben von Patienten  $\leq 60$  Jahre vor.

Die Mikrokernanzahl wies zum Zeitpunkt Woche 0 ähnliche Werte auf. Die Werte lagen bei 4,9 ‰ für Patienten  $> 60$  Jahre und bei 4,0 ‰ für Patienten  $\leq 60$  Jahre. In Woche 2 sowie Woche 4 und 6 wies die Mikrokernanzahl einen leicht erhöhten Wert bei den jüngeren Patienten auf. Die Werte lagen in Woche 2 bei 34,8 ‰ für Patienten  $> 60$  Jahre und bei 36,8 ‰ für Patienten  $\leq 60$  Jahre. In Woche 4 lagen die Werte bei 54,8 ‰ für Patienten  $> 60$  Jahre und bei 59,0 ‰ für Patienten  $\leq 60$  Jahre. Die Werte lagen in Woche 6 bei 51,4 ‰ für Patienten  $> 60$  Jahre und bei 56,1 ‰ für Patienten  $\leq 60$  Jahre. Die Mikrokernanzahl wies zum Zeitpunkt Woche 9 bis 12 wieder ähnliche Werte auf. Die Werte lagen bei 1,4 ‰ für Patienten  $> 60$  Jahre und bei 1,7 ‰ für Patienten  $\leq 60$  Jahre. Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Einfluss des Alters auf die Mikrokernrate nachgewiesen werden.

## 4 Ergebnisse

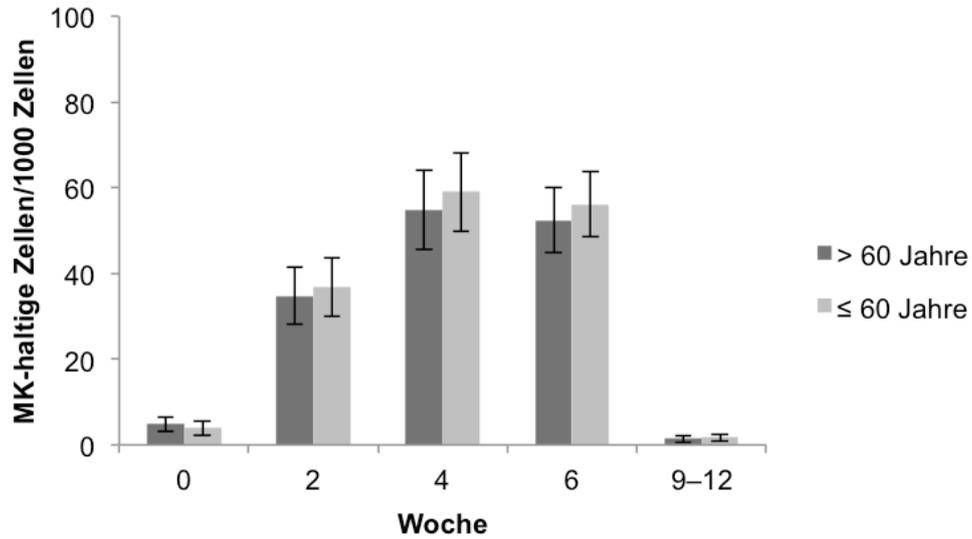


Abb. 13: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche und 9-12 Wochen nach Behandlungsbeginn; Ergebnisse Patientenalter > 60 Jahre und ≤ 60 Jahre; dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $p < 0,05$  im Vergleich der Altersgruppen zum selben Zeitpunkt

## 4.7 Vergleich der Mikrokernraten nach Grading

Es wurde untersucht, ob das Grading des Tumors einen Einfluss auf die Mikrokernrate hat. Dafür wurde die Mikrokernanzahl der verschiedenen Differenzierungsgrade zum selben Zeitpunkt miteinander verglichen und in Abbildung 14 veranschaulicht. Für Woche 0 lagen vier Proben von Patienten mit G1, 12 Proben mit G2 und acht Proben mit G3 vor. Für Woche 2 lagen vier Proben von Patienten mit G1, 11 Proben mit G2 und acht Proben mit G3 vor. Für Woche 4 lagen vier Proben von Patienten mit G1, 11 Proben mit G2 und sieben Proben mit G3 vor. Für Woche 6 lagen drei Proben von Patienten mit G1, zehn Proben mit G2 und fünf Proben mit G3 vor. Für Woche 9 bis 12 lagen zwei Proben von Patienten mit G1, neun Proben mit G2 und vier Proben mit G3 vor.

Die Mikrokernanzahl wies zum Zeitpunkt Woche 0 und Woche 2 ähnliche Werte auf. Die Werte lagen in Woche 0 für G1 bei 6,5 ‰, für G2 bei 5,4 ‰ und für G3 bei 4,0 ‰. In Woche 2 lagen die Werte für G1 bei 36,9 ‰, für G2 bei 35,1 ‰ und für G3 bei 36,8 ‰. Die Mikrokernanzahl wies in Woche 4 und Woche 6 bei G1 und G2 ähnliche Werte auf. Die Werte von G3 waren zu beiden Zeitpunkten im Vergleich etwas erhöht. Die Werte lagen für G1 bei 50,1 ‰, für G2 bei 49,3 ‰ und für G3 bei 59,0 ‰ in Woche 4. In Woche 6 lagen die Werte für G1 bei 50,1 ‰, für G2 bei 51,1 ‰ und für G3 bei 59,0 ‰. Die Mikrokernanzahl wies zum Zeitpunkt Woche 9 bis 12 wieder ähnliche Werte auf. Die Werte lagen für G1 bei 1,3 ‰, für G2 bei 1,7 ‰ und für G3 bei 1,3 ‰. Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Einfluss des Gradings auf die Mikrokernrate festgestellt werden.

## 4 Ergebnisse

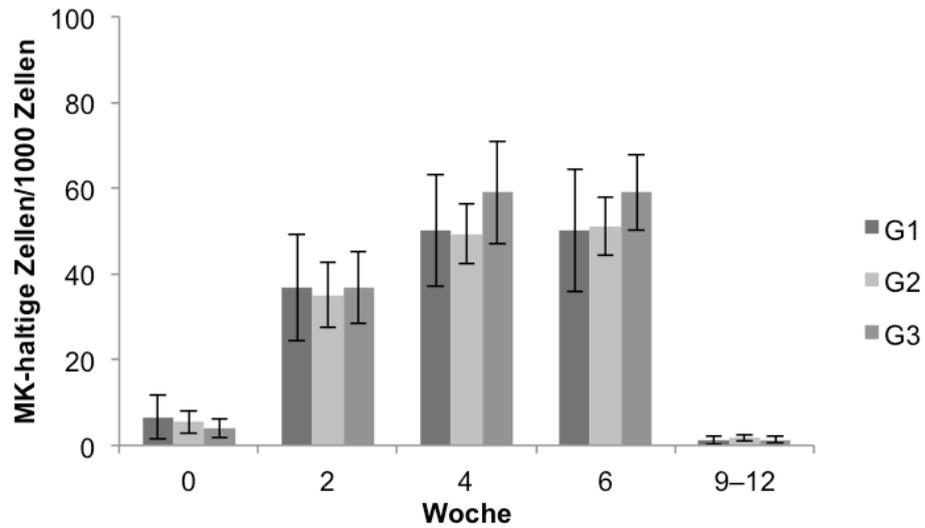


Abb. 14: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche und 9-12 Wochen nach Behandlungsbeginn; Ergebnisse Gradineinstufungen (G) von G1 bis G3; dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $p < 0,05$  im Vergleich der Gradings zum selben Zeitpunkt

## 4.8 Vergleich der Mikrokernraten nach T-Stadium

Es wurde untersucht, ob die Größe des Tumors einen Einfluss auf die Mikrokernrate hat. Dafür wurde die Mikrokernanzahl der verschiedenen T-Stadien zum selben Zeitpunkt miteinander verglichen und in Abbildung 15 veranschaulicht. Für Woche 0 lagen acht Proben von Patienten mit T1, sieben Proben mit T2, vier Proben mit T3 und fünf Proben mit T4 vor. Für Woche 2 lagen acht Proben von Patienten mit T1, sieben Proben mit T2, vier Proben mit T3 und vier Proben mit T4 vor. Für Woche 4 lagen acht Proben von Patienten mit T1, sieben Proben mit T2, drei Proben mit T3 und vier Proben mit T4 vor. Für Woche 6 lagen vier Proben von Patienten mit T1, sieben Proben mit T2, vier Proben mit T3 und vier Proben mit T4 vor. Für Woche 9 bis 12 lagen vier Proben von Patienten mit T1, zwei Proben mit T2, zwei Proben mit T3 und acht Proben mit T4 vor.

Die Mikrokernanzahl wies zum Zeitpunkt Woche 0 und Woche 2 bei T1 bis T3 ähnliche Werte auf. Der Wert von T4 war zu beiden Zeitpunkten im Vergleich etwas niedriger. Die Werte lagen in Woche 0 für T1 bei 4,9 ‰, für T2 bei 5,7 ‰, für T3 bei 4,6 ‰ und für T4 bei 2,9 ‰. In Woche 2 lagen die Werte für T1 bei 34,8 ‰, für T2 bei 34,4 ‰, für T3 bei 33,4 ‰ und für T4 bei 26,2 ‰. Die Mikrokernanzahl wies in Woche 4 bei T1 und T3 ähnliche Werte auf. Der Wert von T2 war im Vergleich etwas niedriger, während dieser von T4 erhöht war. Die Werte lagen für T1 bei 54,8 ‰, für T2 bei 48,7 ‰, für T3 bei 53,5 ‰ und für T4 bei 65,9 ‰. In Woche 6 wies die Mikrokernanzahl bei T2 bis T4 ähnliche Werte auf. Der Wert von T1 war im Vergleich etwas niedriger. Die Werte lagen für T1 bei 44,4 ‰, für T2 bei 51,3 ‰, für T3 bei 53,5 ‰ und für T4 bei 53,6 ‰. Die Mikrokernanzahl wies zum Zeitpunkt Woche 9 bis 12 bei T1 bis T4 ähnliche Werte auf. Die Werte lagen für T1 bei 1,6 ‰, für T2 bei 1,8 ‰, für T3 bei 2,5 ‰ und für T4 bei 1,7 ‰. Während sich in den Wochen 0, 4, 6 und 9 bis 12 kein signifikanter Einfluss der Tumorgöße auf die Mikrokernrate zeigte, konnte in Woche 2 eine Signifikanz zwischen T1 und T4 nachgewiesen werden.

## 4 Ergebnisse

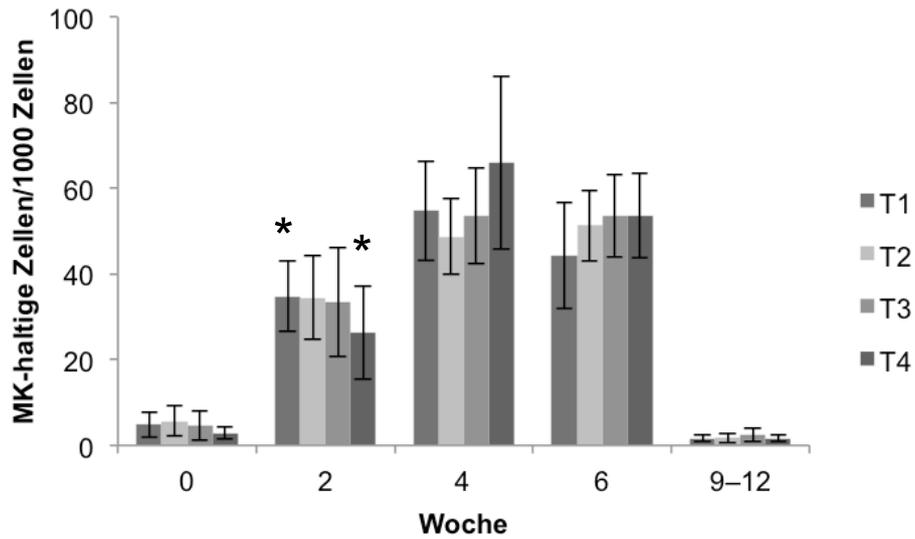


Abb. 15: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche und 9-12 Wochen nach Behandlungsbeginn; Ergebnisse Tumorstadium (T) nach der TNM Klassifikation von T1 bis T4; dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, \*  $p < 0,05$  im Vergleich der T-Stadien zum selben Zeitpunkt

## 5 Diskussion

Epidemiologische Krebsregister schätzen, dass im Jahr 2013 knapp 500.000 Menschen in Deutschland an einem malignen Tumor erkrankt sind. Davon erhalten etwa 17.500 Patienten die Diagnose eines bösartigen Tumors im Kopf-Hals-Bereich (Robert-Koch-Institut, 2015; Robert-Koch-Institut, 2016). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Mikrokernbildung in Mundschleimhautzellen von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren während einer Radio-/Radiochemotherapie darzustellen. Dafür wurden Proben von insgesamt 25 Patienten vor Beginn der Behandlung und in der 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche entnommen sowie bei diesen und neun weiteren Patienten neun bis 12 Wochen nach Behandlungsbeginn. Neben der Darstellung der Veränderung der Mikrokernrate während einer sechswöchigen Strahlentherapie und einigen Wochen nach abgeschlossener Radiatio, wurde auch überprüft, ob Patienten mit malignen Kopf-Hals-Tumoren generell eine erhöhte Mikrokernanzahl aufweisen. Weitere Fragestellungen waren, ob eine zusätzliche Verabreichung einer Chemotherapie, das Geschlecht und das Alter der Patienten sowie auch das Grading und T-Stadium des Tumors einen Einfluss auf die Anzahl der Mikrokerne haben.

Das Patientenkollektiv in dieser Arbeit bestand zu circa 70 % aus männlichen und nur zu 30 % aus weiblichen Patienten. Das Durchschnittsalter der 34 Probanden betrug 60 Jahre, das Durchschnittsalter der männlichen Patienten lag zu Behandlungsbeginn bei 60 Jahren und bei den weiblichen Patienten bei 59 Jahren. Es scheint keinen Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt des Erkrankens und dem Geschlecht vorzuliegen. Alle Tumore gingen von einem Plattenepithel aus und ein Karzinom im Bereich der Mundhöhle war der häufigste Grund für den Beginn einer Behandlung in dieser Studie.

Kopf-Hals-Tumore treten bei Männern mit einer Neuerkrankungsanzahl von 13.000 deutlicher häufiger als bei Frauen mit 4.500 Neuerkrankungen pro Jahr auf. Sie gehören damit bei den Männern in Bezug auf die Erkrankungsrate zu der sechsthäufigsten Krebserkrankung in Deutschland, während sie bei Frauen erst an 15. Stelle stehen (Robert-Koch-Institut, 2015; Robert-Koch-Institut, 2016). Es konnte gezeigt werden, dass Frauen durch das Vorhandensein zusätzlicher Tumorsuppressorgene auf dem zweiten X-Chromosom, welche der

embryonalen Inaktivierung entgehen können, seltener an Krebs erkranken als Männer (Dunford et al., 2017). Des Weiteren weisen Männer einen höheren Alkohol- und Nikotinkonsum als Frauen auf (Krebsforschungszentrum, 2015; GBD Alcohol Collaborators, 2018). Männer erkranken nicht nur häufiger an Tumoren im Bereich der Mundhöhle und des Rachens, sondern auch früher. So liegt das durchschnittliche Alter der männlichen Patienten bei 64 Jahren, bei Frauen hingegen erst bei 66 Jahren. Das Risiko für Mutationen steigt im fortgeschrittenen Alter sowohl durch die ständige Zellerneuerung im Laufe des Lebens als auch durch einen längeren Zeitraum der Exposition mit Kanzerogenen. Ebenfalls weisen Menschen im Alter von 50 bis 64 Jahren den höchsten Alkohol- und Nikotinkonsum auf (Krebsforschungszentrum, 2015; GBD Alcohol Collaborators, 2018). Auch in Bezug auf die Langzeitprognose unterscheiden sich beide Geschlechter. Die relative Überlebensrate von fünf Jahren beträgt bei Männern 51 %, während Frauen mit 61 % eine bessere Langzeitprognose besitzen. Die Lokalisation des Tumors spielt dabei eine wichtige Rolle für die Heilungschancen. So besitzen Tumore an Lippen und Speicheldrüsen eine bessere Prognose als zum Beispiel Tumore des Mundbodens, der Zunge und des Rachens. Das Plattenepithelkarzinom stellt mit 90 % den größten Teil der Tumore dar (Robert-Koch-Institut, 2015; Robert-Koch-Institut, 2016).

Bei der Mehrheit der in dieser Arbeit vorkommenden Patienten lag ein hohes T-Stadium und ein mäßig bis schlecht differenziertes Tumorgewebe vor. So wiesen 72 % aller Patienten eine größere Tumorausdehnung als 2 cm auf, wobei beim größten Anteil mit 11 Patienten ein T4-Stadium diagnostiziert wurde. Ebenfalls den Grad der Tumordifferenzierung betreffend, zeigten 84 % aller Patienten ein mäßig bis schlecht differenziertes Gewebe, während der größte Anteil mit 18 Patienten bei G2 lag.

Es konnte in einer Studie gezeigt werden, dass ein Großteil der Patienten mit einem Tumor im Kopf-Hals-Bereich erst beim Auftreten von Beschwerden oder aufgrund der unspezifischen Symptome zu einem späten Zeitpunkt vorstellig wird, sodass dieser erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wurde. Sie wiesen zu diesem Zeitpunkt meistens schon ein großes Tumolvolumen und den Befall von Lymphknoten auf (Guizard et al., 2017).

Bei der Fragestellung, ob Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren eine höhere Mikrokernrate im Vergleich zu gesunden Probanden aufweisen, konnte diese Arbeit zeigen, dass die Ausgangswerte von Tumorpatienten mit 5,4 ‰ über den Werten der Negativkontrollen mit 2,0 ‰ lagen und damit erhöht waren. Maligne Neoplasien entstehen durch Mutationen gesunder Zellen und der progressiven Proliferation dieser. Es wird an den Ergebnissen deutlich, dass auch in Mundschleimhautzellen von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren eine erhöhte Anzahl von Mikrokernen zu finden ist und damit dort eine erhöhte chromosomale Instabilität herrscht. Ob diese aufgrund des malignen Tumors entstanden ist oder eine genetische Disposition darstellt, ist nicht nachvollziehbar. Ein weiterer Aspekt ist, dass ein Hauptrisikofaktor für Kopf-Hals-Tumore ein chronischer Nikotinabusus ist und bei Rauchern eine erhöhte Mikrokernzahl nachgewiesen werden konnte (Stich et al., 1983; Sarto et al., 1987; Bloching et al., 2000; Cao et al., 2002; Bonassi et al., 2011). Dies sowie andere Lifestylefaktoren können daher ebenfalls zu erhöhten Ausgangswerten geführt haben. Die anamnestischen Hintergründe der untersuchten Patienten wurden in dieser Arbeit nicht näher erfasst.

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl bei Präkanzerosen als auch bei Tumoren im Vergleich zu gesunden Probanden ein erhöhter Mikrokernwert vorliegt (Desai et al., 1996; Bloching et al., 2000; Chatterjee et al., 2009; Bonassi et al., 2011). In der Arbeit von Desai et al. (1996) wurde für die orale submuköse Fibrose, orale Leukoplakie sowie den oralen Lichen Planus eine erhöhte Anzahl von Mikrokernen nachgewiesen. Bloching et al. (2000) konnten in ihrer Arbeit nachweisen, dass Patienten mit Präkanzerosen ähnliche Mikrokernraten wie Patienten mit Karzinomen aufweisen. Dies wurde auch in der Studie von Bonassi et al. (2011) für Patienten mit einer Leukoplakie und einem oropharyngealen Tumor festgestellt. Die Untersuchungen von Chatterjee et al. (2009) hingegen ergaben, dass zwar Präkanzerosen eine höhere Anzahl an Mikrokernen aufweisen im Vergleich zu gesunden Probanden, die Werte aber für Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen nochmals höher lagen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es während einer sechs-wöchigen Radio-/Radiochemotherapie zu einer vermehrten Mikrokernbildung in

Mundschleimhautzellen kommt, wobei die größte DNA-Schädigung innerhalb der ersten vier Wochen der Bestrahlung stattfand. So stieg die Anzahl in der Gruppe der 17 Patienten, in welcher sowohl diejenigen mit Bestrahlungstherapie als auch jene mit zusätzlicher Chemotherapie zusammengefasst wurden, signifikant von 5,4 ‰ vor der Behandlung auf 35,1 ‰ in der zweiten Woche. Danach folgte ein weiterer signifikanter Anstieg der Werte auf 49,3 ‰ in Woche 4 bis zu einem Maximum von 51,1 ‰ in der sechsten Woche. Es konnte zu jedem Zeitpunkt eine statistische Signifikanz zum Ausgangswert festgestellt werden. Betrachtet man nur die neun Patienten, welche mit einer alleinigen Radiotherapie behandelt wurden, wird deutlich, dass die Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen innerhalb der ersten zwei Wochen den größten Anstieg aufwies und sich danach nur noch geringfügig veränderte. So stiegen die Werte von anfangs 5,4 ‰ signifikant auf 36,7 ‰ in der zweiten Woche, in der vierten Woche auf 42,4 ‰ und schließlich in der letzten Bestrahlungswoche auf 48,9 ‰. Bei allen Werten lag eine statistische Signifikanz zum Ausgangswert vor. Die mikrokernhaltigen Zellen der Negativkontrollen blieben hingegen konstant niedrig ohne signifikante Veränderungen. Die Werte lagen zwischen 1,1 und 2,2 ‰. Es kann laut der Studie von Bonassi et al. (2011) ein Bereich von 0,3 bis 1,7 ‰ als normale Anzahl von spontan gebildeten Mikrokerneln angenommen werden. Es kann festgehalten werden, dass ionisierende Strahlung zu einer chromosomalen Instabilität in Mundschleimhautzellen führt. Die Bildung von Mikrokerneln ist abhängig von der Teilungsrate der Zellen, der genomischen Stabilität und ihrer Neigung zum Zelltod. Da Mikrokerne, wie bereits erwähnt, während der Mitose gebildet werden und der Weg einer mitotisch aktiven Basalzelle sieben bis 21 Tage bis zum Stratum superficiale benötigt, sind auch die Mikrokerne frühestens nach diesem Zeitintervall in der obersten Epithelschicht nachweisbar. Dies wird durch den Anstieg der Werte vom Beginn der Behandlung bis zur zweiten Bestrahlungswoche deutlich. Da die Zellteilung ein asynchroner Vorgang ist, das heißt nicht alle Zellen befinden sich in derselben Phase des Zellzyklus, kommt es zu einem weiteren Anstieg der Mikrokernelrate in der vierten Woche der Therapie. Der deutlich geringere Anstieg der Mikrokernelrate zwischen der vierten und sechsten Woche der Behandlung lässt vermuten, dass sich ein Gleichgewicht zwischen der Bildung der Mikrokerne und der Abschilferung der obersten Epithelschicht einstellt.

Die Thematik Mikrokernbildung im Zusammenhang mit Radiatio wurde bereits in mehreren Studien aufgegriffen. In einer der ersten Studien, welche sich mit der Wirkung von ionisierender Strahlung auf die Mundschleimhautzellen beschäftigte, konnte gezeigt werden, dass es bei der Beobachtung eines Patienten während einer dreieinhalbwöchigen Bestrahlung zu einem Anstieg der Mikrokernrate kommt (Stich et al., 1983). Diese Beobachtung konnte in weiteren Studien bestätigt werden (Tolbert et al., 1992; Minicucci et al., 2005). Sarto et al. (1987) konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die Mikrokernrate linear mit der kumulativen Dosis ansteigt und die Bildung von Mikrokernen bei einer therapeutischen Dosis von 2 Gy durch Chromosomenbrüche entsteht. Es zeigte sich ebenfalls, dass es ab einer kumulativen Dosis von 22 Gy zu keinem weiteren Anstieg der Mikrokernrate kam. Auch Cao et al. (2002) konnten einen Anstieg der Mikrokernrate feststellen, jedoch zeigte sich ab einer Dosis von 28 Gy nur noch zu ein geringer Anstieg und die Mikrokernrate erreichte dann ihr Maximum bei 48 Gy, welche gegen Ende der Behandlung bei 68 Gy wieder leicht abgefallen ist. Auch die Ergebnisse von Moore et al. (1996) zeigten, dass die Anzahl der Mikrokerne innerhalb der ersten drei Wochen anstieg und in der letzten Bestrahlungswoche wieder etwas absank. In einer Studie von Bindu et al. (2003) wurde mit 68 Patienten zum ersten Mal ein größeres Patientenkollektiv untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen ab einer kumulativen Dosis von 28 Gy nur noch geringfügig anstieg. Ferner konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Mikrokernrate während der Behandlung und einer gesteigerten Rezidivrate hergestellt werden. Tumore, welche radiosensitiv waren, hatten eine erhöhte Mikrokernrate im Vergleich zu radioresistenten Tumoren. In einer Arbeit aus Indien konnte für Patienten mit einer Radiatio ein Anstieg der Mikrokernrate festgestellt werden, welche nur gering gestiegen ist und ab einer kumulativen Dosis von 50 bis 60 Gy wieder gesunken ist. Es konnte keine statistische Signifikanz zwischen der Anzahl der Mikrokerne und der applizierten Dosis festgestellt werden (Tak et al., 2014).

Bei acht Patienten, welche im Rahmen dieser Arbeit eine Radiochemotherapie erhalten haben, konnte ein signifikanter Anstieg der Mikrokernwerte in den ersten zwei Wochen festgestellt werden. So lag der Anfangswert bei 3,3 ‰,

stieg dann in der zweiten Woche auf 29,7 ‰ und blieb während der vierten und sechsten Woche konstant bei 53,6 ‰. Zu jedem Zeitpunkt unterschieden sich die Mikrokernraten signifikant vom Ausgangswert. Jedoch konnte zu keinem Entnahmezeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Patientengruppen mit alleiniger Radiotherapie und Radiochemotherapie festgestellt werden. Vor Beginn der Behandlung (RT 7,0 ‰; RCT 2,8 ‰) und in der zweiten Woche (RT 39,5 ‰; RCT 30,4 ‰) waren die Werte der Patienten mit alleiniger Radiatio leicht erhöht im Vergleich zu denen der Patienten mit Radiochemotherapie. In der vierten (RT 46,4 ‰; RCT 63,9 ‰) und sechsten Woche (RT 48,9 ‰; RCT 53,6 ‰) war dies jedoch umgekehrt. Drei bis sechs Wochen nach abgeschlossener Behandlung lagen beide Gruppen bei 1,7 ‰. Die Ursache für den erst späten Anstieg der Mikrokernwerte in der vierten Woche der Radiochemotherapie im Vergleich zur Radiotherapie könnte eventuell daran liegen, dass Chemotherapeutika intravenös verabreicht werden und aufgrund ihrer systemischen Wirkung eine längere Zeit benötigen, um in die Basalschicht der Mundschleimhautzellen zu gelangen und die vermehrte Mikrokernbildung daher erst zeitlich verzögert erkennbar wurde. Dass es während der Behandlung nur zu einem geringen Unterschied zwischen beiden Therapiearten kam, lässt sich eventuell mit der Wirkung der unterschiedlichen Zytostatika und Antikörper erklären. Da Cetuximab die Proliferation der Tumorzellen hemmt und Cisplatin zytotoxisch wirkt, können vermutlich nur über die durch 5-FU induzierte Reduzierung der DNA-Stabilität Mikrokerne gebildet werden. Eine weitere Erklärung könnte der zeitliche Zusammenhang zwischen der Probenentnahme und der Verabreichung der Infusion sein, da die Chemotherapeutika im Vergleich zur Strahlentherapie nicht fünfmal wöchentlich für sechs Wochen, sondern nur zu bestimmten Zeitpunkten verabreicht werden.

In Bezug auf die Wirkung von Chemotherapeutika auf das Genom konnte in Studien für die Radiomodulatoren Cisplatin (Sharma und Wilson, 1999; Driessens et al., 2003; Danesi et al., 2012; Rjiba-Touati et al., 2012) und 5-Floururacil (Peters et al., 2000; Danesi et al., 2012) eine schädigende Wirkung an der DNA nachgewiesen werden. Deutlich weniger Arbeiten befassten sich jedoch mit dem Einfluss von Chemotherapeutika auf die Bildung von Mikrokernen in Mundschleimhautzellen. So untersuchten Minicucci et al.

(2008) die Wirkung von verschiedenen Zytostatika bei 20 Kindern mit malignen Tumoren anhand des Mikrokerntests in Lymphozyten und Mundschleimhautzellen. Es wurden dabei Proben vor und während der Behandlung entnommen. Während es in den Lymphozyten zu einer Steigerung der Mikrokernanzahl kam, war keine signifikante Veränderung in den Mundschleimhautzellen zu erkennen. In einer weiteren Studie wurden verschiedene Zytostatikaregimes, unter anderem auch Cisplatin in Kombination mit 5-FU, untersucht (Torres-Bugarin et al., 2004). Es wurden dabei vor Beginn und nach Abschluss der Chemotherapiezyklen Proben von vier Patienten entnommen. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Mikrokernraten in Bezug auf die Verabreichung von Cisplatin und 5-FU festgestellt werden.

Vergleicht man die Mikrokernrate vor Beginn der Therapie und nach abgeschlossener Behandlung, konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Jedoch scheint es, dass die Werte der Patienten drei bis sechs Wochen nach Therapiebeendigung immer unter denen der Anfangswerte lagen. So lagen die Ergebnisse für Patienten mit Radio-/Radiochemotherapie anfänglich bei 4,9 ‰ und nach Abschluss der Therapie bei 1,7 ‰. Bei den Patienten mit alleiniger Bestrahlungstherapie lagen die Werte vor Beginn der Behandlung bei 7 ‰ und nachher bei 1,7 ‰, bei Patienten mit Radiochemotherapie vorher bei 2,8 ‰ und in der Nachsorgephase bei 1,7 ‰. Es zeigt sich, dass durch eine adjuvante Radio-/Radiochemotherapie nicht nur eine maximale Remission und eine lokoregionäre Kontrolle des Tumors, sondern auch eine Verminderung der chromosomalen Instabilität in Bezug auf die Mikrokernkerne zu erreichen ist. So lagen die Werte nach abgeschlossener Behandlung mit 1,7 ‰ wieder in dem von Bonassi et al. (2011) beschriebenen Bereich der spontan gebildeten Mikrokernkerne. Vergleicht man nun die voran genannten Ergebnisse der letzten Bestrahlungswoche mit den Werten drei bis sechs Wochen nach Behandlungsabschluss ist ein deutlicher Rückgang der Mikrokernanzahl erkennbar. Dies lässt vermuten, dass es mit fehlender Exposition durch ionisierende Strahlung zu keiner weiteren induzierten Bildung von Mikrokernen kommt, sondern nur zu spontan gebildeten Mikrokernen. Eine sechswöchige Strahlentherapie mit einer durchschnittlichen Gesamtdosis von 64,8 Gy führt daher zu keiner dauerhaften Genomschädigung in den Zellen der Mundschleim-

haut. Aufgrund der Regenerationszeit der Mundschleimhautzellen von sieben bis 21 Tagen, sind drei bis sechs Wochen nach Behandlungsabschluss und fehlender Strahlenexposition keine erhöhten Mikrokernwerte mehr nachweisbar. Wie sich die Mikrokernrate nach abgeschlossener Bestrahlung verhält, untersuchten Stich et al. (1983) an sieben Patienten, welche mit einer Gesamtdosis von 50 bis 60 Gy bestrahlt wurden. Nach fünf bis sieben Tagen konnte man einen Rückgang der Mikrokernrate erkennen. Auch Sarto et al. (1987) kamen zu dem Ergebnis, dass nach sieben bis 12 Tagen nach abgeschlossener Therapie die Ausgangswerte der Mikrokernanzahl erreicht wurden. In der Arbeit von Moore et al. (1996) wurde der Ausgangswert drei Wochen nach abgeschlossener Therapie erreicht. Minicucci et al. (2005) konnten zwar ebenfalls zeigen, dass der Wert nach Abschluss der Behandlung wieder abgesunken ist, jedoch war dieser immer noch erhöht im Vergleich zum Ausgangswert.

In Bezug auf die Mikrokernraten bei Frauen und Männern konnte kein signifikanter Unterschied abgeleitet werden. Die Ergebnisse für Frauen und für Männer wiesen bei allen Zeitpunkten annähernd die gleichen Werte auf. Nur in der vierten Woche waren die Werte der Männer im Vergleich zu den Frauen leicht erhöht. Jedoch sind die Ergebnisse aufgrund der ungleichen Beteiligung von Männern mit 70 % und Frauen mit 30 % nur bedingt aussagekräftig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit der Studie von Bonassi et al. (2011), welche ebenfalls keinen Unterschied in der Mikrokernrate für die Geschlechter feststellen konnte. Auch wenn in vielen Studien das Geschlecht der Probanden angegeben wurde, wurde der Zusammenhang zwischen Mikrokernrate und Geschlecht oft nicht berücksichtigt.

Zu keinem Zeitpunkt wurden statistische Unterschiede der Mikrokernrate in Bezug auf den Malignitätsgrad des Tumors festgestellt. Die Anzahl der Mikrokernrate in Bezug auf die verschiedenen Grading-Einteilungen war vor Beginn der Therapie, in der zweiten Woche und nach abgeschlossener Behandlung ähnlich. In der vierten und sechsten Woche waren die Werte von G3 höher als von G1 und G2. Die gewebliche Differenzierung des Primärtumors hatte somit keinen Einfluss auf den Verlauf der Mikrokernrate während einer Strahlentherapie.

Bezüglich der Tumorgröße konnte mit einer Ausnahme ebenfalls kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. In der zweiten Woche wurde ein signifikanter Unterschied beim Vergleich vom T1- und T4-Stadium festgestellt. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte die Zusammensetzung der Proben zu diesem Zeitpunkt sein. So erhielten sechs Patienten mit einem T1-Tumor eine alleinige Strahlentherapie und nur zwei Patienten eine Radiochemotherapie. Die Gruppe der T4-Tumore erhielt in der zweiten Woche ausschließlich eine Radiochemotherapie. In dem vorangegangenen Vergleich der Patienten mit Radio- und Radiochemotherapie in Woche 2 konnte man erkennen, dass Patienten mit einer Radiotherapie eine höhere Mikrokernrate aufweisen als Patienten mit einer Radiochemotherapie, was im Zusammenhang mit der Verteilung der Patientengruppen in Woche 2 den signifikanten Unterschied beider Gruppen erklären könnte. Bei den T2- und T3-Stadien lagen hingegen in der zweiten Woche nicht so ausgeprägte Unterschiede in der Zusammensetzung der Proben von Radio- zu Radiochemotherapie vor. Untersuchungen von Minicucci et al. (2005) konnten beim T3-Stadium eine signifikant erhöhte Mikrokernrate vor Beginn der Strahlentherapie feststellen.

Das Alter der Patienten hatte in dieser Studie ebenfalls keinen Einfluss auf die Mikrokernrate. Die nach dem Alter eingeteilten Patientengruppen hatten vor Beginn und nach Abschluss der Therapie jeweils ähnliche Werte. Patienten, welche 60 Jahre oder jünger waren, hatten während der sechswöchigen Behandlung leicht erhöhte Werte im Vergleich zu den Älteren.

Dazu sind in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse zu finden. Während Sarto et al. (1987) keinen Einfluss des Lebensalters auf die Mikrokernrate nachweisen konnten, zeigte die Studie von Minicucci et al. (2005) eine signifikante Erhöhung der Mikrokernrate bei Patienten unter 60 Jahren. Dagegen beobachteten Bonassi et al. (2011) einen Anstieg der Mikrokernrate mit steigendem Alter. Das Durchschnittsalter der Patienten von 60 Jahren in dieser Arbeit zeigt, dass vorwiegend ältere Patienten an der Studie teilgenommen haben und die Ergebnisse zur Altersabhängigkeit der Mikrokernraten daher nur bedingt aussagekräftig sind.

Eine Korrelation zwischen dem Anstieg der Mikrokernrate und einer Strahlentherapie konnte sowohl in allen bisherigen Studien als auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Es stellt sich jedoch die Frage, warum die Ergebnisse in manchen Punkten voneinander abweichen. Den unterschiedlichen Mikrokernraten können verschiedene Ursachen zugrunde liegen. So spielt unter anderem die Wahl der Färbung eine wichtige Rolle im Studienaufbau. In Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von DNA-spezifischen Färbungen wie zum Beispiel der Feulgen-Färbung die präzisesten Ergebnisse in der Differenzierung von Mikrokernen und nuklearen Anomalien erzielt, während eine DNA-unspezifische Färbung wie zum Beispiel die Giemsa-Färbung die Mikrokernanzahl erhöht, da sie auch andere zelluläre Strukturen wie zum Beispiel Keratohyalin oder Bakterien anfärbt (Nersesyan et al., 2006; Holland et al., 2008; Bonassi et al., 2011). Vergleicht man weiter die Feulgen-Fast-Green-Färbung mit einer fluoreszenzbasierten Methode, wurden keine Abweichungen der Mikrokernraten beobachtet, jedoch ist die Auswertung mit dem Mikrokerntest durch die schärfere Abgrenzung und bessere Darstellung von Mikrokernen und Nebenphänomenen wie zum Beispiel Karyorrhesis erleichtert (Titenko-Holland et al., 1994). Die in dieser Arbeit verwendete Kombination von Chromomycin A<sub>3</sub>, welches ein für Guanin-Cytosin spezifisches Fluorochrom ist und den Zellkern anfärbt sowie Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper, welche das Zytoplasma anfärben, wurde in keiner der erwähnten Studien verwendet. Der Vorteil dieser Färbungsart ist, dass sie leicht durchführbar und farbstabil ist. Durch die DNA-spezifische Färbung hebt sich der Zellkern deutlich vom Zytoplasma ab und eine klare Abgrenzung zu Artefakten ist dadurch möglich. Bonassi et al. (2011) konnten darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen der Art der Probenentnahme und der Mikrokernrate ableiten. So lagen die Werte von Präparaten, welche mit einem Metallspatel entnommen wurden, mit 5,47 ‰ deutlich höher als bei den Proben, welche mithilfe eines Zungenspatels oder einer Zahnbürste gewonnen wurden. Die Anzahl der Mikrokerne war mit 2,0 bis 2,63 ‰ etwa um die Hälfte reduziert. Die Entnahme von Mundschleimhautzellen mithilfe einer Cytobrush hatte die deutlich niedrigsten Werte mit 0,63 ‰.

Auch gilt es, gewisse anamnestische Hintergründe zu berücksichtigen. Die Genese von Kopf-Hals-Tumoren hat einen multifaktoriellen Ursprung und wird

meist durch exogene Faktoren verursacht. Der Hauptrisikofaktor für Kopf-Hals-Tumore ist ein chronischer Nikotin- und Alkoholabusus, der jeweils die Wahrscheinlichkeit an einem Karzinom zu erkranken um das Sechsfache steigert. Studien konnten ebenfalls zeigen, dass bei der Kombination beider Faktoren ein bis zu 30-fach erhöhtes Risiko vorliegt (Talamini et al., 2002). Für Tumore im Kopf-Hals-Bereich können des Weiteren ein übermäßiger Verzehr von Fleisch (Oreggia et al., 2001) und gebratenem Essen (Bosetti et al., 2002), HPV (Dahlstrom et al., 2003; Herrero et al., 2003), mechanische Traumata durch zum Beispiel eine Prothesendruckstelle, allergisch-chemisch-toxische Irritationen und eine genetische Disposition (Serefoglou et al., 2008) als Ursachen angesehen werden. Es wurde ebenfalls nachgewiesen, dass zum Beispiel die Anzahl der Mikrokerne bei Rauchern erhöht ist (Stich et al., 1983; Sarto et al., 1987; Bloching et al., 2000; Cao et al., 2002; Bonassi et al., 2011). In ihrer Studie konnten Bloching et al. (2000) sogar eine signifikante Korrelation zwischen der Dauer und Menge des Zigarettenkonsums und der Mikrokernrate feststellen. Der Abusus von Alkohol scheint hingegen auf die Mikrokernrate keinen Einfluss zu haben (Sarto et al., 1987; Bloching et al., 2000). Auch die Ernährung spielt eine Rolle. Durch die Einnahme von Vitamin A und B,  $\beta$ -Carotin (Thomas et al., 2011) oder auch durch vermehrten Verzehr von Früchten (Bonassi et al., 2011) kann die Anzahl der Mikrokerne reduziert werden. Das berufliche Umfeld kann ebenfalls die Bildung von Mikrokernen beeinflussen. So konnte zum Beispiel ein Einfluss von Pestiziden (Gomez-Arroyo et al., 2000; Sailaja et al., 2006) festgestellt werden. Ebenfalls war eine erhöhte Mikrokernrate bei Arbeitern, welche im Bereich der Verchromung tätig sind (Sudha et al., 2011), sowie beim Umgang mit Arsen, wie es in der Glasindustrie verwendet wird (Gamino-Gutierrez et al., 2013), oder mit Lösungsmitteln im Malerbereich (Pinto et al., 2000) zu beobachten.

Es ist auch zu überlegen, ob die Lokalisation des Tumors und der damit zusammenhängende Bestrahlungsbereich einen Einfluss auf die Ergebnisse haben könnte. So liegt das Bestrahlungsfeld eines Mundbodenkarzinoms wesentlich näher an der Wangenschleimhaut, dem Ort der Probenentnahme, als zum Beispiel ein Larynxkarzinom.

Der Mikrokerntest ist eine etablierte Untersuchungsmethode zur Darstellung der Einflüsse von mutagenen und karzinogenen Substanzen auf den menschlichen

Organismus. Jedoch gab es lange keine standardisierten Vorgaben zur Beurteilung der Zellen. Viele Studien orientieren sich an den von Tolbert et al. (1992) vorgegebenen Kriterien. Erst im Rahmen des HUMN wurden einheitliche Beurteilungskriterien für den Mikrokerntest an Mundschleimhautzellen festgelegt (Thomas et al., 2009). Eine subjektive Beurteilung des Mikrokerntests durch den Auswertenden ist jedoch selbst dann nicht völlig auszuschließen. Die Geübtheit des Auswertenden in der Differenzierung der nuklearen Anomalien und der Mikrokerne ist ebenfalls ein wichtiger Punkt.

Abschließend kann festgehalten werden, dass in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu vorangegangenen Studien ein größeres Probandenkollektiv mit 34 Patienten beobachtet wurde, um die Mikrokernbildung in Mundschleimhautzellen während einer Radio-/Radiochemotherapie zu untersuchen. Um die Entwicklung der Mikrokernrate genauer darzustellen, wurden den Patienten während einer sechswöchigen Bestrahlung und drei bis sechs Wochen nach abgeschlossener Therapie Proben entnommen. Die Ergebnisse zeigten, dass Patienten, welche an einem Tumor im Kopf-Hals-Bereich erkrankt sind, im Vergleich zu gesunden Probanden eine erhöhte Mikrokernrate aufwiesen. Während der Radiatio konnte ein Anstieg der Mikrokernrate festgestellt werden, wobei die Bildung von Mikrokernen in den ersten vier Wochen am höchsten war. Drei bis sechs Wochen nach abgeschlossener Behandlung sanken die Werte der Patienten wieder und erreichten Werte im Bereich spontan entstehender Mikrokerne. Die Tumorgöße betreffend, konnte in der zweiten Woche der Bestrahlung ein signifikanter Unterschied zwischen dem T1- und dem T4-Stadium beobachtet werden. Eine zusätzliche Verabreichung einer Chemotherapie, das Alter, das Geschlecht und der Grad der Tumordifferenzierung hatten keinen Einfluss auf die vermehrte Bildung von Mikrokernen während einer Radiatio.

## 6 Zusammenfassung

Nach Schätzungen sind unter den im Jahr 2013 aufgetretenen Krebserkrankungen in Deutschland circa 17.500 Menschen von einem Tumor im Kopf-Hals-Bereich betroffen (Robert-Koch-Institut, 2016). Oft ist die alleinige operative Resektion des Tumors aufgrund der hohen Rezidivanfälligkeit nicht ausreichend und Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren müssen sich daher einer adjuvanten postoperativen Radio-/Radiochemotherapie unterziehen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mikrokernbildung während einer Radio-/Radiochemotherapie von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren darzustellen. Das Patientenkollektiv, welches Tumore im Kopf-Hals-Bereich aufwies, wurde postoperativ mit einer Radio-/Radiochemotherapie therapiert. Als Nachweismethode wurde der Mikrokerntest an Mundschleimhautzellen angewendet. Es wurden vor Beginn der Behandlung, in der zweiten, vierten und sechsten Woche der Bestrahlung und nach drei bis sechs Wochen nach Behandlungsabschluss Abstriche der Mundschleimhaut entnommen. Die Patienten erhielten Einzeldosen von 1,7 bis 2,2 Gy bei durchschnittlich 30,6 Fraktionen über einen Zeitraum von sechs Wochen im Zuge einer normofraktionierten intensitätsmodulierten Strahlentherapie. Als Zytostatika wurden Cisplatin und 5-Floururacil sowie der Antikörper Cetuximab verwendet. Insgesamt lagen Ergebnisse von 35 Patienten vor. Ein Patient wurde aufgrund einer bereits zu Beginn der Behandlung vorliegenden hohen Mikrokernrate aus der Studie ausgeschlossen. Von den insgesamt 34 Patienten erhielten 14 Patienten eine alleinige Bestrahlungstherapie und 20 Patienten noch eine zusätzliche Chemotherapie. Das Durchschnittsalter des Patientenkollektivs betrug 60 Jahre und es waren mit 70 % deutlich mehr Männer als Frauen in der Studie integriert. Zehn Probanden dienten als Negativkontrollen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass im Vergleich zu gesunden Probanden Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren bereits erhöhte Ausgangswerte in der Mikrokernrate aufwiesen. Dies kann ein Zeichen für eine chromosomale Instabilität sein, welche mit der Tumorbildung assoziiert oder durch eine genetische Disposition bedingt sein kann, als auch durch Risikofaktoren, welche zur Ausbildung von malignen Kopf-Hals-Tumoren führen, wie zum Beispiel ein erhöhter Nikotinkonsum. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass es

zu einer vermehrten Bildung von Mikrokernen während einer sechswöchigen Radio-/Radiochemotherapie kam. Da Mikrokerne während der Mitose in den Basalzellen der Mundschleimhaut gebildet werden, deren Weg bis zur obersten Epithelschicht sieben bis 21 Tage benötigt und sich nicht alle Zellen in derselben Zellzyklusphase befinden, war der größte Anstieg der Mikrokernrate innerhalb der ersten vier Wochen der Behandlung zu beobachten. Der deutlich geringere Anstieg der Mikrokernrate zwischen der vierten und sechsten Woche wurde als Anzeichen für ein Gleichgewicht zwischen der Bildung von Mikrokernen und der Abschilferung der obersten Epithelschicht gewertet. Nach Therapiebeendigung sanken die Werte nach drei bis sechs Wochen und lagen unter dem Ausgangswert in dem Bereich von spontan entstehenden Mikrokernen. Dies lässt darauf schließen, dass es durch ionisierende Strahlung zu keiner dauerhaften Schädigung des Genoms kommt, da es mit fehlender Exposition zu keiner weiteren induzierten Bildung von Mikrokernen kommt. In Bezug auf die Tumorgroße konnte nur in der zweiten Woche ein signifikanter Unterschied in der Mikrokernrate zwischen T1- und T4-Stadium beobachtet werden, was sich durch die ungleichen Fallzahlen für Radiotherapie und Radiochemotherapie zu diesem Zeitpunkt erklären lässt. Es konnte keine Korrelation zwischen einer zusätzlichen Chemotherapie und einem Anstieg der Mikrokernrate festgestellt werden, was durch die systemische Wirkung, die Angriffspunkte der unterschiedlichen Chemotherapeutika und den zeitlichen Zusammenhang zwischen Probenentnahme und Applikation der Chemotherapie erklärt werden kann. Alter und Geschlecht der Patienten hatten keinen Einfluss auf die Bildung von Mikrokernen. Jedoch sind die Ergebnisse zu Alter und Geschlecht nur bedingt aussagekräftig, da der Großteil der Patienten ein höheres Alter aufwies und deutlich mehr Proben von Männern vorlagen. Der Grad der Tumordifferenzierung hatte ebenfalls keine Auswirkung auf die Mikrokernraten. Abschließend kann festgehalten werden, dass in dieser Arbeit durch die Untersuchung eines Kollektivs von insgesamt 34 Patienten, welches während einer sechswöchigen Strahlentherapie und drei bis sechs Wochen nach Behandlungsabschluss beobachtet wurde, gezeigt werden konnte, dass es zu einem Anstieg von Mikrokernen in Mundschleimhautzellen kommt und diese nach Abschluss der Behandlung wieder auf die Werte sinken, die spontan entstehenden Mikrokernen bei gesunden Patienten entsprechen.

## 7 Literaturverzeichnis

**Adelstein, D. J., Li, Y., Adams, G. L., Wagner, H., Jr., Kish, J. A., Ensley, J. F., Schuller, D. E. und Forastiere, A. A. (2003):**

An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J Clin Oncol* 21(1): 92-98.

**Andrae, U. (1996):**

Gentoxizitätstest in vitro. *Toxikologie*. Weinheim, Greim, H., Deml, E., VCH: 130-160.

**Barranco, S. C., Romsdahl, M. M. und Humphrey, R. M. (1971):**

The radiation response of human malignant melanoma cells grown in vitro. *Cancer Res* 31(6): 830-833.

**Bernier, J., Cooper, J. S., Pajak, T. F., van Glabbeke, M., Bourhis, J., Forastiere, A., Ozsahin, E. M., Jacobs, J. R., Jassem, J., Ang, K. K. und Lefebvre, J. L. (2005):**

Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (22931) and RTOG (9501). *Head Neck* 27(10): 843-850.

**Bernier, J., Dometge, C., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefebvre, J. L., Greiner, R. H., Giralt, J., Maingon, P., Rolland, F., Bolla, M., Cognetti, F., Bourhis, J., Kirkpatrick, A., van Glabbeke, M., European Organization for, R. und Treatment of Cancer, T. (2004):**

Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 350(19): 1945-1952.

**Bindu, L., Balaram, P., Mathew, A., Remani, P., Bhattathiri, V. N. und Nair, M. K. (2003):**

Radiation-induced changes in oral carcinoma cells - a multiparametric evaluation. *Cytopathology* 14(5): 287-293.

**Biomarkers Definitions Working, G. (2001):**

Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69(3): 89-95.

**Bloching, M., Hofmann, A., Lautenschlager, C., Berghaus, A. und Grummt, T. (2000):**

Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. *Oral Oncol* 36(6): 550-555.

**Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., Holland, N., Kirsh-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Carnesoltas, D., Cavallo, D., da Silva, J., de Andrade, V. M., Demircigil, G. C., Dominguez Odio, A., Donmez-Altuntas, H., Gattas, G., Giri, A., Giri, S., Gomez-Meda, B., Gomez-Arroyo, S., Hadjidekova, V., Haveric, A., Kamboj, M., Kurteshi, K., Martino-Roth, M. G., Montero Montoya, R., Nersesyan, A., Pastor-Benito, S., Favero Salvadori, D. M., Shaposhnikova, A., Stopper, H., Thomas, P., Torres-Bugarin, O., Yadav, A. S., Zuniga Gonzalez, G. und Fenech, M. (2011):**

The HUman MicroNucleus project on exfoLiated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res* 728(3): 88-97.

**Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R. K., Raben, D., Baselga, J., Spencer, S. A., Zhu, J., Youssoufian, H., Rowinsky, E. K. und Ang, K. K. (2010):**

Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 11(1): 21-28.

**Bosetti, C., Talamini, R., Levi, F., Negri, E., Franceschi, S., Airoldi, L. und La Vecchia, C. (2002):**

Fried foods: a risk factor for laryngeal cancer? *Br J Cancer* 87(11): 1230-1233.

**Bourhis, J., Rivera, F., Mesia, R., Awada, A., Geoffrois, L., Borel, C., Humblet, Y., Lopez-Pousa, A., Hitt, R., Vega Villegas, M. E., Duck, L., Rosine, D., Amellal, N., Schueler, A. und Harstrick, A. (2006):**

Phase I/II study of cetuximab in combination with cisplatin or carboplatin and fluorouracil in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 24(18): 2866-2872.

**Brierley, J., Gospodarowicz M., Wittekind C. (2017):**

UICC TNM classification of malignant tumours. 8th Chichester: Wiley.

**Burtneß, B., Goldwasser, M. A., Flood, W., Mattar, B., Forastiere, A. A. und Eastern Cooperative Oncology, G. (2005):**

Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 23(34): 8646-8654.

**Cairns, J. (1975):**

Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 255(5505): 197-200.

**Cao, J., Liu, Y., Sun, H., Cheng, G., Pang, X. und Zhou, Z. (2002):**

Chromosomal aberrations, DNA strand breaks and gene mutations in nasopharyngeal cancer patients undergoing radiation therapy. *Mutat Res* 504(1-2): 85-90.

**Chatterjee, S., Dhar, S., Sengupta, B., Ghosh, A., De, M., Roy, S., Raychowdhury, R. und Chakrabarti, S. (2009):**

Cytogenetic monitoring in human oral cancers and other oral pathology: the micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Toxicol Mech Methods* 19(6-7): 427-433.

**Cooper, J. S., Pajak, T. F., Forastiere, A., Jacobs, J., Fu, K. K., Ang, K. K., Laramore, G. E. und Al-Sarraf, M. (1998):**

Precisely defining high-risk operable head and neck tumors based on RTOG 85-03 and 88-24: targets for postoperative radiochemotherapy? *Head Neck* 20(7): 588-594.

**Cooper, J. S., Pajak, T. F., Forastiere, A. A., Jacobs, J., Campbell, B. H., Saxman, S. B., Kish, J. A., Kim, H. E., Cmelak, A. J., Rotman, M., Machtay, M., Ensley, J. F., Chao, K. S., Schultz, C. J., Lee, N., Fu, K. K. und Radiation Therapy Oncology Group, I. (2004):**

Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 350(19): 1937-1944.

**Coughlin, C. T. und Richmond, R. C. (1989):**

Biologic and clinical developments of cisplatin combined with radiation: concepts, utility, projections for new trials, and the emergence of carboplatin. *Semin Oncol* 16(4 Suppl 6): 31-43.

**Dahlstrom, K. R., Adler-Storthz, K., Etzel, C. J., Liu, Z., Dillon, L., El-Naggar, A. K., Spitz, M. R., Schiller, J. T., Wei, Q. und Sturgis, E. M. (2003):**

Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clin Cancer Res* 9(7): 2620-2626.

**Danesi, C. C., Dihl, R. R., Bellagamba, B. C., de Andrade, H. H., Cunha, K. S., Guimaraes, N. N. und Lehmann, M. (2012):**

Genotoxicity testing of combined treatment with cisplatin, bleomycin, and 5-fluorouracil in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 747(2): 228-233.

**de Bree, R., Deurloo, E. E., Snow, G. B. und Leemans, C. R. (2000):**

Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope* 110(3 Pt 1): 397-401.

**Desai, S. S., Ghaisas, S. D., Jakhi, S. D. und Bhide, S. V. (1996):**

Cytogenetic damage in exfoliated oral mucosal cells and circulating lymphocytes of patients suffering from precancerous oral lesions. *Cancer Lett* 109(1-2): 9-14.

**Dietz, A. (2009):**

Aspekte der Chirurgie bei Kopf-Hals-Tumoren. *Onkologisch* 3: 4-6.

**Dizdaroglu, M. (1992):**

Measurement of radiation-induced damage to DNA at the molecular level. *Int J Radiat Biol* 61(2): 175-183.

**Driessens, G., Harsan, L., Browaeys, P., Giannakopoulos, X., Velu, T. und Bruyns, C. (2003):**

Assessment of in vivo chemotherapy-induced DNA damage in a p53-mutated rat tumor by micronuclei assay. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 775-779.

**Dunford, A., Weinstock, D. M., Savova, V., Schumacher, S. E., Cleary, J. P., Yoda, A., Sullivan, T. J., Hess, J. M., Gimelbrant, A. A., Beroukhim, R., Lawrence, M. S., Getz, G. und Lane, A. A. (2017):**

Tumor-suppressor genes that escape from X-inactivation contribute to cancer sex bias. *Nat Genet* 49(1): 10-16.

**Fenech, M. und Crott, J. W. (2002):**

Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res* 504(1-2): 131-136.

**Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E. und Bonassi, S. (1999):**

The HUmAn MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res* 428(1-2): 271-283.

**Gamino-Gutierrez, S. P., Gonzalez-Perez, C. I., Gonsebatt, M. E. und Monroy-Fernandez, M. G. (2013):**

Arsenic and lead contamination in urban soils of Villa de la Paz (Mexico) affected by historical mine wastes and its effect on children's health studied by micronucleated exfoliated cells assay. *Environ Geochem Health* 35(1): 37-51.

**Garcia Sar, D., Montes-Bayon, M., Aguado Ortiz, L., Blanco-Gonzalez, E., Sierra, L. M. und Sanz-Medel, A. (2008):**

In vivo detection of DNA adducts induced by cisplatin using capillary HPLC-ICP-MS and their correlation with genotoxic damage in *Drosophila melanogaster*. *Anal Bioanal Chem* 390(1): 37-44.

**GBD Alcohol Collaborators (2018):**

Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 392(10152): 1015-1035.

**Gomez-Arroyo, S., Diaz-Sanchez, Y., Meneses-Perez, M. A., Villalobos-Pietrini, R. und De Leon-Rodriguez, J. (2000):**

Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutat Res* 466(1): 117-124.

**Guizard, A. N., Dejardin, O. J., Launay, L. C., Bara, S., Lapotre-Ledoux, B. M., Babin, E. B., Launoy, G. D. und Ligier, K. A. (2017):**

Diagnosis and management of head and neck cancers in a high-incidence area in France: A population-based study. *Medicine (Baltimore)* 96(26): e7285.

**Haughey, B. H., Gates, G. A., Arfken, C. L. und Harvey, J. (1992):**

Meta-analysis of second malignant tumors in head and neck cancer: the case for an endoscopic screening protocol. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 101(2 Pt 1): 105-112.

**Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J., Plevin, E. und Scheiner, J. (1957):**

Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 179(4561): 663-666.

**Herrero, R., Castellsague, X., Pawlita, M., Lissowska, J., Kee, F., Balaram, P., Rajkumar, T., Sridhar, H., Rose, B., Pintos, J., Fernandez, L., Idris, A., Sanchez, M. J., Nieto, A., Talamini, R., Tavani, A., Bosch, F. X., Reidel, U., Snijders, P. J., Meijer, C. J., Viscidi, R., Munoz, N., Franceschi, S. und Group, I. M. O. C. S. (2003):**

Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 95(23): 1772-1783.

**Hintzsche, H., Reimann, H., Stopper, H. (2018):**

Schicksal von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen. *BIOspektrum* 24(4): 379-381.

**Hintzsche, H. und Stopper, H. (2010):**

Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of mobile phone users. *Toxicol Lett* 193(1): 124-130.

**Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S. und Fenech, M. (2008):**

The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res* 659(1-2): 93-108.

**Huang, S. M., Bock, J. M. und Harari, P. M. (1999):**

Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 59(8): 1935-1940.

**Huang, Y., Hou, H., Yi, Q., Zhang, Y., Chen, D., Jiang, E., Xia, Y., Fenech, M. und Shi, Q. (2011):**

The fate of micronucleated cells post X-irradiation detected by live cell imaging. *DNA Repair (Amst)* 10(6): 629-638.

**Kam, M. K., Leung, S. F., Zee, B., Chau, R. M., Suen, J. J., Mo, F., Lai, M., Ho, R., Cheung, K. Y., Yu, B. K., Chiu, S. K., Choi, P. H., Teo, P. M., Kwan, W. H. und Chan, A. T. (2007):**

Prospective randomized study of intensity-modulated radiotherapy on salivary gland function in early-stage nasopharyngeal carcinoma patients. *J Clin Oncol* 25(31): 4873-4879.

**Kam, M. K., Teo, P. M., Chau, R. M., Cheung, K. Y., Choi, P. H., Kwan, W. H., Leung, S. F., Zee, B. und Chan, A. T. (2004):**

Treatment of nasopharyngeal carcinoma with intensity-modulated radiotherapy: the Hong Kong experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 60(5): 1440-1450.

**Knecht, R. (2009):**

Radiotherapy, chemotherapy and target therapy for treatment of head and neck cancer : new developments. *HNO* 57(5): 436-445.

**Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Simopoulos, C., Turley, H., Talks, K., Gatter, K. C. und Harris, A. L. (2002):**

Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53(5): 1192-1202.

**Krebsforschungszentrum, D. (2015):**

Tabakatlas Deutschland 2015. 1: 38-39.

**Kwong, D. L., Pow, E. H., Sham, J. S., McMillan, A. S., Leung, L. H., Leung, W. K., Chua, D. T., Cheng, A. C., Wu, P. M. und Au, G. K. (2004):**

Intensity-modulated radiotherapy for early-stage nasopharyngeal carcinoma: a prospective study on disease control and preservation of salivary function. *Cancer* 101(7): 1584-1593.

**Lee, N., Xia, P., Quivey, J. M., Sultanem, K., Poon, I., Akazawa, C., Akazawa, P., Weinberg, V. und Fu, K. K. (2002):**

Intensity-modulated radiotherapy in the treatment of nasopharyngeal carcinoma: an update of the UCSF experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53(1): 12-22.

**Littbrand, B. und Revesz, L. (1969):**

The effect of oxygen on cellular survival and recovery after radiation. *Br J Radiol* 42(504): 914-924.

**Merlano, M., Benasso, M., Corvo, R., Rosso, R., Vitale, V., Blengio, F., Numico, G., Margarino, G., Bonelli, L. und Santi, L. (1996):**

Five-year update of a randomized trial of alternating radiotherapy and chemotherapy compared with radiotherapy alone in treatment of unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Natl Cancer Inst* 88(9): 583-589.

**Minicucci, E. M., Kowalski, L. P., Maia, M. A., Pereira, A., Ribeiro, L. R., de Camargo, J. L. und Salvadori, D. M. (2005):**

Cytogenetic damage in circulating lymphocytes and buccal mucosa cells of head-and-neck cancer patients undergoing radiotherapy. *J Radiat Res* 46(2): 135-142.

**Minicucci, E. M., Ribeiro, D. A., de Camargo, B., Costa, M. C., Ribeiro, L. R. und Favero Salvadori, D. M. (2008):**

DNA damage in lymphocytes and buccal mucosa cells of children with malignant tumours undergoing chemotherapy. *Clin Exp Med* 8(2): 79-85.

**Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., Fujibuchi, W., Naitoh, T., Ogawa, H., Ando, T., Yazaki, N., Watanabe, K., Haneda, S., Shibata, C. und Sasaki, I. (2010):**

5-fu metabolism in cancer and orally-administrable 5-fu drugs. *Cancers (Basel)* 2(3): 1717-1730.

**Moore, L. E., Warner, M. L., Smith, A. H., Kalman, D. und Smith, M. T. (1996):**

Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* 27(3): 176-184.

**Nersesyan, A., Kundi, M., Atefie, K., Schulte-Hermann, R. und Knasmuller, S. (2006):**

Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(10): 1835-1840.

**Nordsmark, M., Bentzen, S. M., Rudat, V., Brizel, D., Lartigau, E., Stadler, P., Becker, A., Adam, M., Molls, M., Dunst, J., Terris, D. J. und Overgaard, J. (2005):**

Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol* 77(1): 18-24.

**Oreggia, F., De Stefani, E., Boffetta, P., Brennan, P., Deneo-Pellegrini, H. und Ronco, A. L. (2001):**

Meat, fat and risk of laryngeal cancer: a case-control study in Uruguay. *Oral Oncol* 37(2): 141-145.

**Peters, G. J., van Triest, B., Backus, H. H., Kuiper, C. M., van der Wilt, C. L. und Pinedo, H. M. (2000):**

Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed. *Eur J Cancer* 36(7): 916-924.

**Pignon, J. P., Bourhis, J., Domenge, C. und Designe, L. (2000):**

Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* 355(9208): 949-955.

**Pignon, J. P., le Maitre, A., Maillard, E., Bourhis, J. und Group, M.-N. C. (2009):**

Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol* 92(1): 4-14.

**Pigorsch, S. U., Wilkens, J. J., Kampfer, S., Kehl, V., Hapfelmeier, A., Schlager, C., Bier, H., Schwaiger, M. und Combs, S. E. (2017):**

Do selective radiation dose escalation and tumour hypoxia status impact the loco-regional tumour control after radio-chemotherapy of head & neck tumours? The ESCALOX protocol. *Radiat Oncol* 12(1): 45.

**Pinto, D., Ceballos, J. M., Garcia, G., Guzman, P., Del Razo, L. M., Vera, E., Gomez, H., Garcia, A. und Gonsebatt, M. E. (2000):**

Increased cytogenetic damage in outdoor painters. *Mutat Res* 467(2): 105-111.

**Rjiba-Touati, K., Ayed-Boussema, I., Skhiri, H., Belarbia, A., Zellema, D., Achour, A. und Bacha, H. (2012):**

Induction of DNA fragmentation, chromosome aberrations and micronuclei by cisplatin in rat bone-marrow cells: protective effect of recombinant human erythropoietin. *Mutat Res* 747(2): 202-206.

**Robert-Koch-Institut (2015):**

Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe: 26-29.

**Robert-Koch-Institut (2016):**

Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. 57-60.

**Rodgers, L. W., Jr., Stringer, S. P., Mendenhall, W. M., Parsons, J. T., Cassisi, N. J. und Million, R. R. (1993):**

Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth. *Head Neck* 15(1): 16-19.

**Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E. und Mansour, V. H. (1969):**

Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 222(5191): 385-386.

**Rubin Grandis, J., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D. und Tweardy, D. J. (1998):**

Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 90(11): 824-832.

**Sailaja, N., Chandrasekhar, M., Rekhadevi, P. V., Mahboob, M., Rahman, M. F., Vuyyuri, S. B., Danadevi, K., Hussain, S. A. und Grover, P. (2006):**

Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutat Res* 609(1): 74-80.

**Sarto, F., Finotto, S., Giacomelli, L., Mazzotti, D., Tomanin, R. und Levis, A. G. (1987):**

The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis* 2(1): 11-17.

**Schmid, W. (1975):**

The micronucleus test. *Mutat Res* 31(1): 9-15.

**Schwenzer-Zimmerer, K., Kansy, K., Zeilhofer, H.-F., Zippelius, A., Zimmermann, F. (2010):**

Adjuvante Therapie bei Kopf-Hals-Tumoren-State of the Art. *Der MKG-Chirurg* 3(1): 25-29.

**Serefoglou, Z., Yapijakis, C., Nkenke, E. und Vairaktaris, E. (2008):**  
Genetic association of cytokine DNA polymorphisms with head and neck cancer. *Oral Oncol* 44(12): 1093-1099.

**Sharma, V. M. und Wilson, W. R. (1999):**  
Radiosensitization of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck with cisplatin during concomitant radiation therapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 256(9): 462-465.

**Steel, G. G. und Peckham, M. J. (1979):**  
Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5(1): 85-91.

**Stich, H. F., San, R. H. und Rosin, M. P. (1983):**  
Adaptation of the DNA-repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells. *Ann N Y Acad Sci* 407: 93-105.

**Studer, G., Furrer, K., Davis, B. J., Stoeckli, S. S., Zwahlen, R. A., Luetolf, U. M. und Glanzmann, C. (2006):**  
Postoperative IMRT in head and neck cancer. *Radiat Oncol* 1: 40.

**Sudha, S., Kripa, S. K., Shibily, P. und Shyn, J. (2011):**  
Elevated Frequencies of Micronuclei and other Nuclear Abnormalities of Chrome Plating Workers Occupationally Exposed to Hexavalent Chromium. *Iran J Cancer Prev* 4(3): 119-124.

**Tak, A., Metgud, R., Astekar, M. und Tak, M. (2014):**  
Micronuclei and other nuclear anomalies in normal human buccal mucosa cells of oral cancer patients undergoing radiotherapy: a field effect. *Biotech Histochem* 89(6): 464-469.

**Talamini, R., Bosetti, C., La Vecchia, C., Dal Maso, L., Levi, F., Bidoli, E., Negri, E., Pasche, C., Vaccarella, S., Barzan, L. und Franceschi, S. (2002):**  
Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control* 13(10): 957-964.

**Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S. und Fenech, M. (2009):**  
Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 4(6): 825-837.

**Thomas, P., Wu, J., Dhillon, V. und Fenech, M. (2011):**  
Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 26(1): 69-76.

**Titenko-Holland, N., Moore, L. E. und Smith, M. T. (1994):**

Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutat Res* 312(1): 39-50.

**Tolbert, P. E., Shy, C. M. und Allen, J. W. (1992):**

Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res* 271(1): 69-77.

**Torres-Bugarin, O., Ventura-Aguilar, A., Zamora-Perez, A., Gomez-Meda, B. C., Ramos-Ibarra, M. L., Morga-Villela, G., Gutierrez-Franco, A. und Zuniga-Gonzalez, G. (2004):**

Evaluation of cisplatin + 5-FU, carboplatin + 5-FU, and ifosfamide + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. *Mutat Res* 565(1): 91-101.

**Torres-Bugarin, O., Zavala-Cerna, M. G., Nava, A., Flores-Garcia, A. und Ramos-Ibarra, M. L. (2014):**

Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. *Dis Markers* 2014: 956835.

**Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H. R., Cupissol, D., Peyrade, F., Benasso, M., Vynnychenko, I., De Raucourt, D., Bokemeyer, C., Schueler, A., Amellal, N. und Hitt, R. (2008):**

Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359(11): 1116-1127.

**Ward, J. F. (1988):**

DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35: 95-125.

## 8 Anhang

### 8.1 Chemotherapieansätze

Tab. 1: Chemotherapieregime Cisplatin wöchentlich

Tag	Substanz	Dosis	Menge	Applikation
1./8./15. /22.	NaCl 0,9 %	40 mg/m <sup>2</sup>	1000 ml	über 90 min
	Glucose 5 %		1000 ml	über 90 min
	Antiemese		100 ml	über 15 min
	Mannitol 20 %		250 ml	über 30 min
	Cisplatin			über 30 min
	NaCl 0,9 %		1000 ml	über 90 min
	Glucose 5 %		1000 ml	über 90 min

Tab. 2: Chemotherapieregime Cisplatin mono

Tag	Substanz	Dosis	Menge	Applikation
1.–5./ 21.–25.	NaCl 0,9 %	20 mg/m <sup>2</sup>	1000 ml	über 60 min
	Mannitol 20 %		250 ml	über 15 min
	Antiemese		100 ml	über 15 min
	Cisplatin			in 250 ml NaCl 0,9 % über 30 min
	Glucose 5 %		1000 ml	über 60 min

Tab. 3: Chemotherapieregime Cisplatin/5-FU

Tag	Substanz	Dosis	Menge	Applikation
0	NaCl 0,9 %		500 ml	über 90 min
	Glucose 5 %		500 ml	über 90 min
1./29.	Glucose 5 %	60 mg/m <sup>2</sup>	1000 ml	über 90 min
	NaCl 0,9 %		1000 ml	über 90 min
	Mannitol 20 %		250 ml	über 30 min
	Ondansetron		8 mg	in 100 ml NaCl 0,9 %
	Cisplatin			in 250 ml NaCl 0,9 % über 60 min
2.–4./ 30.–32.	Glucose 5 %	1000 mg/m <sup>2</sup>	1000 ml	über 90 min
	5-FU			in 1000 ml NaCl 0,9 % über 24 h
2.–4./ 30.–32.	NaCl 0,9 %	1000 mg/m <sup>2</sup>	500 ml	in 1000 ml NaCl 0,9 % über 24 h
	5-FU			

Tab. 4: Chemotherapieregime Cisplatin/Cetuximab

Tag	Substanz	Dosis	Menge	Applikation
1./21.	NaCl 0,9 % Antiemese Cetuximab	400 (250) mg/m <sup>2</sup>	1000 ml 200 ml	über 60 min über 30 min in 500 (250) ml NaCl 0,9 % über 120 (60) min
	Mannitol 20 % Cisplatin		250 ml	über 15 min in 250 ml NaCl 0,9 % über 30 min
	Glucose 5 %		1000 ml	über 60 min
2.-5./ 22.-25.	NaCl 0,9 % Mannitol 20 % Antiemese Cisplatin	20 mg/m <sup>2</sup>	1000 ml 250 ml 100 ml	über 60 min über 15 min über 15 min in 250 ml NaCl 0,9 % über 30 min
	Glucose 5 %		1000 ml	über 60 min

Tab. 5: Chemotherapieregime Cetuximab/Cisplatin/5-FU

Tag	Substanz	Dosis	Menge	Applikation
1./21.	NaCl 0,9 % Antiemese Cetuximab	2000 ml/m <sup>2</sup>	200 ml	6 h vor Cisplatin über 30 min über 120 (60) min
	Cisplatin	400 (250) mg/m <sup>2</sup> 75 mg/m <sup>2</sup>		in 250 ml NaCl 0,9 % über 60 min
	NaCl 0,9 %	2000 ml/m <sup>2</sup>		über 12 h
	5-FU	750 mg/m <sup>2</sup>		in 250 ml NaCl 0,9 % über 24 h
2.-5./ 22.-25.	5-FU	750 mg/m <sup>2</sup>		in 250 ml NaCl 0,9 % über 24 h

## 8.2 Auswertungsergebnisse

Tab. 6: Angaben zu Geschlecht und Alter der Patienten sowie Lokalisation, Grading und Staging des Tumors und zur Therapie bezüglich verabreichter Einzeldosen, Fraktionen und Chemotherapie der Patienten; \* ausgeschlossener Patient

Patient	Geschlecht	Alter	Lokalisation Tumor	Grading/ Staging	Einzeldosis; Fraktionen; Chemotherapie
1	m	71	Oropharynx	G2/T1	2,2 Gy; 30
2	m	68	Parotis	G1/T2	2 Gy; 30
3	m	77	Larynx	G2/T2	2,2 Gy; 30
4	m	22	Zungenrand	G3/T1	2,2 Gy; 30
5	m	54	Tonsille	G3/T2	2,2 Gy; 30
6	m	79	Gaumen	G2/T1	2/2,2 Gy; 30
7	m	45	Mundboden	G1/T1	2/2,2 Gy; 30
8	m	77	Spinaliom	G3/T3	2/2,2 Gy; 30
9	m	65	Zunge	G2/T2	2/2,2 Gy; 30
10	w	58	Oberkiefer	G1/T1	2,2 Gy; 30
11	m	57	CUP	G2/Tx	2,2 Gy; 30
12	m	50	Mundboden	G3/T1	2 Gy; 30
13	w	52	Mundboden	G1/T1	2,2 Gy; 30
14	m	60	Zunge	G2/T3	2,1 Gy; 33
15	m	48	Mundboden	G2/T4	2,2 Gy; 30; Cisplatin/ 5-Fu/Cetuximab
16	m	49	Zungenrand	G2/T2	2,2 Gy; 30; Cis- platin/Cetuximab 1. Woche + Cisplatin mono 5. Woche
17	m	62	Oberkiefer	G2/T4	2/2,2 Gy; 30; Cisplatin mono
18	m	74	Kieferhöhle	G1/T4	2/2,2 Gy; 30; Cisplatin mono
19	m	58	Unterkiefer	G2/T4	2,2 Gy; 30; Cisplatin/Cetuximab
20	m	55	Hypopharynx	G2/T2	2,2 Gy; 30; Cisplatin wöchentlich
21	w	53	Larynx	G2/T3	2/2,2 Gy; 30; Cisplatin/5-FU
22	w	64	Tonsille	G3/T3	2,1/1,7 Gy; 33; Cisplatin wöchentlich
23	w	61	Oropharynx	G2/T2	2/2,2 Gy; 30; Cisplatin wöchentlich
24	m	62	Pharynx/ Larynx	G3/T3	1,7/2,2 Gy; 33; Cisplatin wöchentlich
25	m	72	Oropharynx	T4	2,1 Gy; 33; Cisplatin wöchentlich
26	m	50	Oropharynx	G3/T1	2,1 Gy; 33; Cisplatin wöchentlich
27	w	55	Tonsille	G3/T1	2/2,2 Gy; 30; Cisplatin wöchentlich
28*	w	73	Wange /Lippen	G2/T3	2 Gy; 30; Cisplatin/Cetuximab
29	w	62	Oro-/ Hypopharynx	G2/T4	1,8/2,0/2,1 Gy; 33; Cisplatin wöchentlich
30	w	60	Tonsille	G2/T2	2,0/2,2 Gy; 30; Cisplatin wöchentlich
31	m	60	Zunge/ Larynx	G3/T4	1,8/2,0/2,1 Gy; 33; Cisplatin wöchentlich
32	w	61	Oberkiefer	G3/T4	2,2 Gy; 30; Cisplatin mono
33	w	70	Unterkiefer	G2/T4	2,2 Gy; 30; Cisplatin mono
34	w	49	Unterkiefer	G2/T4	2,2 Gy; 30; Cisplatin mono
35	m	54	Kieferwinkel	G2/T4	2,2 Gy; 30; Cisplatin mono

Tab. 7: Angaben zu Geschlecht und Alter der Negativkontrollen sowie die Auswertungsergebnisse: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten: Woche 0, 2, 4, 6 und 9-12

Patient	Geschlecht	Alter	0	2	4	6	9-12
NK 1	m	38	5	0	2	1,5	0
NK 2	m	21	3,5	1,5	1,5	1	1,5
NK 3	m	22	0	0,5	0,5	0,5	0,75
NK 4	w	56	0,5	5	5	0,5	1,25
NK 5	w	24	0	2	2	2	4,5
NK 6	m	29	1,5	-	-	-	-
NK 7	m	29	5	-	-	-	-
NK 8	w	22	2	-	-	-	-
NK 9	w	54	0,5	-	-	-	-
NK 10	w	28	1,5	-	-	-	-

Tab. 8: Auswertungsergebnisse: Anzahl MK-haltiger Zellen/1000 Zellen von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung: Woche 0 (vor Behandlungsbeginn), 2., 4. und 6. Bestrahlungswoche und 9-12 Wochen nach Behandlungsbeginn; \* ausgeschlossener Patient

Patient	0	2	4	6	9-12
1	0,5	47,5	60,5	49,5	0
2	33	12	12,5	17,5	-
3	0,5	5	6,5	18	3
4	11	57	86,5	91	-
5	0	38	23	50	-
6	1	28	39	46,5	-
7	0	75,5	51,5	38	-
8	2	19,5	39	49	-
9	1	48	63,5	81	-
10	27	85,5	38,5	-	2
11	8	-	45,5	-	-
12	0,5	19	91	-	-
13	-	-	-	-	0,5
14	-	-	-	-	3
15	8,5	22,5	80	55,5	0
16	4,5	62	57	33	-
17	0	22	68	86	-
18	1	22	23	36	-
19	10,5	2,5	-	-	-
20	3	1	42,5	64,5	-
21	0	37,5	43,5	43	-
22	1	23,5	50,5	42,5	-
23	1	74	64,5	68,5	-
24	1	28,5	-	30	4,5
25	1	-	164	77	1
26	4	38,5	78,5	-	0,5
27	1,5	31	31	-	-
28*	111,5	59	54,5	114,5	-
29	-	-	-	-	0
30	-	-	-	-	0
31	-	-	-	-	1
32	-	-	-	-	2
33	-	-	-	-	1,5
34	-	-	-	-	1
35	-	-	-	-	7

## 8.3 Verwendete Materialien

Tab. 9: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Firma
Chromomycin A <sub>3</sub>	Sigma, Steinheim (D)
DABCO	Sigma, Steinheim (D)
EDTA	Roth, Karlsruhe (D)
ETOH	Roth, Karlsruhe (D)
Glycerol	Sigma, Steinheim (D)
H <sub>2</sub> O	Universitätsbezug (D)
KCl	Merck, Darmstadt (D)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt (D)
MgCl <sub>2</sub>	AppliChem, Darmstadt (D)
Methanol	Roth, Karlsruhe (D)
NaCl	Roth, Karlsruhe (D)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt (D)
Pen/Strep	PAA, Cölbe (D)
Tris HCl	AppliChem, Darmstadt (D)
anti- $\alpha$ -Tubulin Antikörper	Sigma, Steinheim (D)

Tab. 10: Verwendete Materialien

Materialien	Firma
Deckgläser	Hartenstein, Würzburg (D)
Falconröhrchen 14 ml	Greiner, Frickenhausen (D)
Feuchte Kammer	Nunc, Roskilde (DK)
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Objektträger	Hartenstein, Würzburg (D)
Wattestäbchen	Roth, Karlsruhe (D)

Tab. 11: Verwendete Geräte

Geräte	Firma
Casy-Counter	Innovatis, Reutlingen (D)
Cytospin Thermoshandon	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Flow	Gelaide, Sydney (AUS)
Inkubationsschrank	Heraeus, Hanau (D)
Kamera DS-5 MC	Nikon, Amsterdam (NL)
Mikroskop Eclipse TE 2000-E	Nikon, Amsterdam (NL)
Pipetboy	Brand, Wertheim (D)
Pipetten	Gilson, Den Haag (NL)
Zentrifuge Labofuge 400e	Heraeus, Hanau (D)

Es wurden folgende Lösungen für die Probenentnahme, Aufbereitung der Mundschleimhautzellen sowie die Färbung der Präparate angesetzt:

- **PBS-Lösung** zum Verdünnen anderer Lösungen:  
8 g NaCl  
0,2 g KCl  
0,58 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 100 ml H<sub>2</sub>O
- **NaCl 0,9 %** als Extraktionslösung für Mundschleimhautzellen:  
9 g NaCl  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O
- **MSH-Puffer** zum Waschen der Mundschleimhautzellen:  
1,576 g Tris HCl  
29,22 g EDTA  
1,17 g NaCl  
10 ml Penicillin/Streptomycin  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O
- **Chromomycin-Lösung 100 µM** zur Färbung von Mundschleimhautzellen:  
10 mg Chromomycin A<sub>3</sub>  
84,5 ml PBS/MgCl<sub>2</sub> 150 mM
- **Tubulin-Lösung** zur Färbung von Mundschleimhautzellen:  
98 ml PBS  
2 ml anti-α-Tubulin Antikörper
- **DABCO-Eindeckmittel** als Antibleichmittel:  
10 ml PBS  
250 mg DABCO  
90 ml Glycerol

## Danksagungen

Mein Dank gilt insbesondere Frau Professor Dr. Helga Stopper für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Referats sowie für ihre ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Arbeit.

Herrn Dr. Henning Hintzsche danke ich für seine ausgezeichnete Betreuung, seine Unterstützung und Geduld über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich herzlichst bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises von Frau Professor Dr. Stopper bedanken. Dabei seien Frau Silvana Wunram und Frau Maria Scheurich, welche mich bei den Laborarbeiten immer tatkräftig unterstützt haben, besonders hervorzuheben

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Michael Flentje für die Ermöglichung dieser Arbeit, die Bereitstellung der Patienten und die stets problemlose Zusammenarbeit, Herrn Priv.-Doz. Dr. Bülent Polat für die ausgezeichnete Organisation und Betreuung dieser Studie sowie allen Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsklinik Würzburg für ihre Unterstützung.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich von Herzen für ihre Geduld und den mentalen Beistand.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Victoria Kristina Schewe

## Beruflicher Werdegang

seit 06/2018 Angestellte Kieferorthopädin, Ludwigsburg  
04/2018 Anerkennung als Fachzahnärztin für Kieferorthopädie  
03/2017-02/2018 Weiterbildungsassistentin für Kieferorthopädie,  
LMU München  
12/2014-01/2017 Weiterbildungsassistentin für Kieferorthopädie,  
Sindelfingen  
04/2013-09/2014 Vorbereitungsassistentin, Stuttgart

## Hochschulausbildung

07/2012 Approbation als Zahnärztin  
06/2012 Zahnärztliche Prüfung  
03/2009 Zahnärztliche Vorprüfung  
09/2007 Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
WS 2006-SS 2012 Studium der Zahnmedizin an der  
Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

## Schulbildung

06/2006 Allgemeine Hochschulreife  
2001-2006 Schule Schloss Salem, Salem  
1997-2001 Fürstenberg-Gymnasium, Donaueschingen  
1993-1997 Lucian-Reich-Grundschule, Hüfingen

## Publikation

Hintzsche, H., Polat, B., Schewe, V., Djuzenova, C.S.,  
Pfreundner, L., Flentje, M., Stopper, H. (2012):  
Micronucleus formation kinetics in buccal mucosa  
cells of head and neck cancer patients undergoing  
radiotherapy. Toxicology Letters 212: 33-37.