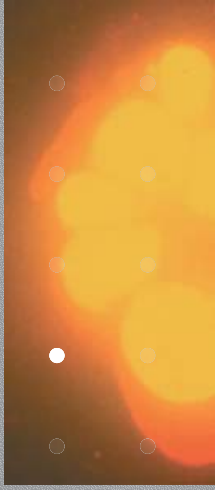


Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. M. Flentje



# Vergleich von in-vitro-Ergebnissen im Mikrokerntest und den klinischen Beobachtungen nach Bestrahlung

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Matthias Müller

aus Böbingen a. d. Rems



Würzburg, Mai 2004

Referent: Prof. Dr. M. Flentje  
Koreferentin: Prof. Dr. H. Stopper  
Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Mai 2004

Der Promovend ist Arzt

## Inhaltsverzeichnis

### Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vorbemerkungen	1
1.2	Allgemeines	1
1.3	Behandlungsplan	3
1.3.1	Chirurgie	3
1.3.2	Adjuvante Strahlentherapie	4
1.3.3	Adjuvante und neoadjuvante Chemo-/Hormontherapie	5
1.4	Komplikationen der Strahlentherapie	5
1.5	Zielsetzung der Arbeit	8
1.6	Einleitende Bemerkungen zu (in-vitro) Zellkulturen und Modellvorstellungen	8
1.7	Wachstumsverhalten einzelner Zellen – Zellzyklus	8
1.8	Wachstumsverhalten von Zellen als Gewebe – Wachstumszyklus eines Gewebes	10
1.9	Störung der Zellvermehrung nach Bestrahlung	11
1.10	Verwendetes Testsystem – der Mikrokerntest (MN-Assay)	12
1.11	Problem des Testsystems	14
1.12	Durchflusszytometrie mittels Propidiumjodid (PI)	16
2	Material und Methoden	19
2.1	Zellkultur – Fibroblasten	19
2.2	Zellkultur – Lymphozyten	20
2.3	Präparate für Mikrokerntest	21
2.4	Durchflusszytometrie	21
2.5	Anfärbung und Auswertung des Mikrokerntests	22
2.6	Auswertung der Durchflusszytometrie	23
2.7	Chemikalien	23
2.8	Geräte, Computer und Software	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Vorversuche	25
3.1.1	Vorbemerkungen	25
3.1.2	Experimente mit humanen Fibroblasten	25
3.1.3	Experimente mit humanen Lymphozyten	27
3.1.4	Vergleich der Kontrollwerte von verschiedenen Patienten	27

3.1.5	Einfluss des Alters der Spender auf die Mikrokernfrequenz	29
3.1.6	Einfluss der Bestrahlung auf die Mikrokernfrequenz	30
3.2	In-vitro-Ergebnisse	31
3.2.1	Vergleich von Lymphozyten und Fibroblasten	31
3.2.2	Vergleich von MN-Frequenz und S-Fraktion bei Fibroblasten	31
3.2.3	Betrachtung des Verhaltens der S-Fraktion im intraindividuellen Vergleich in Abhängigkeit von der jeweiligen Bestrahlungsdosis	32
3.2.4	Vergleich der Ergebnisse der Lymphozyten vor und nach Strahlentherapie innerhalb des Normalkollektivs (nPat)	32
3.3	Klinische Ergebnisse	33
3.4	Vergleich der klinischen mit den in-vitro-Ergebnissen	33
3.5	Zusammenfassung	34
4	Diskussion	37
4.1	Vorbemerkungen	37
4.2	Ergebnisanalyse – Literaturanalyse	37
4.3	Testsystemanalyse – Problemanalyse	40
4.4	Biologische Bedeutung der Mikrokerne	41
4.5	Zusammenfassung – Schlussbemerkungen	45
5	Literaturverzeichnis	47
6	Anhang	55
6.1	Anschauungsmodell nach Bagwell (1993)	55
6.2	Mathematische Herleitung der Wachstumsfunktion	56
6.3	Zahlentafeln der Ergebnisse der Fibroblasten	58
6.4	Zahlentafeln der Ergebnisse der Lymphozyten	60
6.5	Patientendaten	62

# 1 Einleitung

## 1.1 Vorbemerkungen

Die Humanmedizin, wie auch andere wissenschaftliche Fachbereiche, unterliegen aufgrund der Komplexität der Inhalte und deren Beziehungen zueinander einer eigenständigen, teilweise international angepassten Sprache und Ausdrucksform. Sofern es möglich war, sind im Textfluss einzelne Fachausdrücke der deutschen Sprache angeglichen (jeweilige Bedeutung in Klammern beistehend). Doch war dies nicht an jeder Stelle möglich oder sinnvoll. Anatomische Strukturen werden gemäß der aktuellen Pariser Nomenklatur (Nomina anatomica) von 1955 in der letzten Fassung von 1997 (Sao Paulo), molekularbiologische Mechanismen und Zusammenhänge bzw. Techniken sind gemäß ihrer in der Literatur am weitest verbreiteten Ausdrucksform (meist in englischer Sprache) benannt.

Aussageverkettungen folgen den Regeln der Booleschen Algebra. So ist im Falle der *oder*-Verknüpfung, die Aussage als richtig zu betrachten, sofern ein Teil der Verknüpfung an sich bzw. beide Teile zusammen erfüllt sind. Die umgangssprachlich gebräuchliche Anwendung des »ausschließlichen oders« ist als solches unmissverständlich gekennzeichnet: »entweder ... oder«.

Insgesamt unterliegt diese Arbeit den Regeln der Neuen Deutschen Rechtschreibung gemäß des Beschlusses der Kultusministerkonferenz vom 30. November / 1. Dezember 1995 mit Gültigkeit zum 1. August 1998.

## 1.2 Allgemeines

Das Mammakarzinom der Frau (Brustdrüsenkrebs) ist nicht als unheilbare und in der Mehrzahl der Fälle auch nicht als eine primär generalisierte Erkrankung anzusehen. Das bedeutet, es ist nicht in jedem Fall von einer systemischen Verschleppung von malignen (bösaertiger) Tumorzellen innerhalb des Körpers auszugehen. Gemäß einer Veröffentlichung von Fletcher (1993) überleben ungefähr 40 % der Patientinnen mit positivem axillaren Lymphknotenbefund (Nachweis von metastatischen Zellen nach histologischer Aufarbeitung der entnommenen Achsellymphknoten) 15 Jahre ohne Anwendung einer adjuvanten (unterstützenden) Chemotherapie rezidivfrei und können als geheilt gelten. Deshalb kommt einer adäquaten lokalen Behandlung ein besonderes Gewicht zu.

So findet sich in der aktuellen Fachliteratur, z. B. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Mammakarzinome, des Tumorzentrums München (1998), dass die Therapie des Mammakarzinoms heute durch eine Individualisierung des Vorgehens gekennzeichnet ist, wobei das Ausmaß des operativen Eingriffs individu-

ell bestimmt werden muss. Auf Basis neuer Erkenntnisse über die Tumorbiologie und den Krankheitsverlauf wurde in Verbindung mit einer modernen Bestrahlungstechnik das brusterhaltende Behandlungskonzept entwickelt. Ziel dieses Vorgehens ist es, der Patientin die eigene Brust mit möglichst intaktem Erscheinungsbild und möglichst normaler Konsistenz zu erhalten, ohne jedoch die lokale Tumorkontrolle und die Chance auf Heilung der Patientin zu gefährden. Die Einteilung des Tumorstadiums, d. h. die Tumorgroße bzw. dessen Ausbreitung auf andere, primär benachbarte aber auch sekundär betroffene Organe, erfolgt gemäß der internationalen Tumorklassifikation der *Union internationale contre la cancer* (UICC). Eine stadienangepasste Therapie stellt die Grundlage der modernen Onkologie dar. Diese Therapieschemata unterliegen aufgrund ständiger Bezugnahme auf neueste Forschungsergebnisse und empirisch gewonnenen Daten einem steten Wandel. So zeigte sich konkret für das Mammakarzinom bei der Auswertungen der gewonnenen Ergebnisse, dass die brusterhaltende Operation kombiniert mit einer anschließenden Strahlenbehandlung bei kleinen Tumoren gleiche Ergebnisse aufweist wie die modifizierte radikale Mastektomie (z. B. Veronesi 1989, Fisher 1989, Sarrazin 1989, Findlay 1985, Blichert-Toft 1992).

Unter den Voraussetzungen der richtigen Indikationsstellung, der ausreichenden operativen Erfahrung und einer engen Kooperation der Operateure mit den Strahlentherapeuten, hat sich die brusterhaltende Therapie beim kleinen Mammakarzinom weltweit als Standardtherapie etabliert; vgl. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Mammakarzinome (1998), Tumorzentrum München.

TNM	Beschreibung
Tis	Carcinoma in situ
T1	mic mikroinvasiver Tumor: Ausdehnung <0,1 cm
	a Tumor >0,1 cm < 0,5 cm größte Ausdehnung
	b Tumor >0,5 cm < 1 cm größte Ausdehnung
	c Tumor > 1 cm < 2 cm größte Ausdehnung
T2	Tumor > 2 cm < 5 cm größte Ausdehnung
T3	Tumor > 5 cm größte Ausdehnung
T4	Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf die Brustwand oder Haut, wobei:
	a Ausdehnung auf Brustwand
	b Ödem, Ulzerationen der Brusthaut oder Satellitenknötchen der gleichen Brust
	c Kriterien T4a und T4b gemeinsam
	d entzündliches (inflammatorisches) Karzinom
N1	Metastasen in beweglichen, ipsilateralen axillären Lymphknoten, wobei:
	a nur Mikrometastasen <0,2 cm
	b Metastasen im Lymphknoten, zumindest eine >0,2 cm
N2	Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an anderen Strukturen
N3	Metastasen in Lymphknoten entlang der Arteria mammaria interna
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

**Einteilung der Tumorstadien**  
nach TNM-Klassifikation (UICC 1997) anhand des postoperativ gewonnenen pathoanatomischen bzw. histopathologischen Befundes

**Tabelle 1.1**

### 1.3 Behandlungsplan

#### 1.3.1 Chirurgie

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung befinden sich 80–90 % aller Mammakarzinome in einem gut operablen und 5–10 % der Patientinnen in einem lokal fortgeschrittenen oder selten in einem primär metastasierten Stadium. Für die überwiegende Anzahl aller Patientinnen steht die chirurgische Therapie am Anfang des Behandlungskonzeptes. Zur lokalen Tumorkontrolle bei dem brusterhaltenden Operationsverfahren folgt postoperativ die adjuvante Strahlentherapie. Die maximale Größe der für dieses Vorgehen geeigneten Tumoren ist noch in Diskussion, aber für Tumoren (gemäß der TNM-Klassifikation n. UICC) im Stadium pT1 als gesichert und für pT2-Tumoren als möglich anzusehen. Eine obere Tumorgrenze lässt sich jedoch nicht einfach definieren, da das Größenverhältnis zwischen Tumor und Brust für das kosmetische Resultat günstig sein muss. Bei diesem Eingriff, der sog. Tumorektomie: wide excision, handelt es sich um die Entfernung eines maximal bis zu 5 cm großen (T2-Stadium) Mammatumors (abhängig von der Brustgröße) einschließlich eines Randsaums im gesunden Gewebe. Unter Berücksichtigung der Kontraindikationen (I) inkomplette Tumorauscheidung auch nach eventuell mehrmaliger Nachresektion, (II) multizentrische Karzinome, (III) Zeichen des inflammatorischen Karzinoms, (IV) ausgedehnte lymphatische Beteiligung (Lymphangiosis carcinomatosa), kommen ca. 70 % der Patientinnen für die brusterhaltende Therapie in Betracht.

3

lokale Therapie					
brusterhaltende Operation + axillare Lymphadenektomie + adjuvante Strahlentherapie			Ablatio mammae + axillare Lymphadenektomie		
adjuvante systemische Therapie					
Nodalstatus	Grading	Rezeptorstatus	prämenopausal	postmenopausal	Senium
N0 T1b	G1	ER +	–	–	–
T1	G2	ER +	Tamoxifen	Tamoxifen	Tamoxifen
T2	G3	ER +	CMF	Tamoxifen	Tamoxifen
		ER –	CMF	CMF	CMF
N1 (1–3LK)		ER +	CMF	Tamoxifen	Tamoxifen
		ER –	CMF	CMF	CMF
N1 (>3LK)		Adriamycin (4 Zyklen) + Cyclophosphamid oder Hochdosis-Chemotherapie			

Tabelle 1.2

#### Therapiekonzept

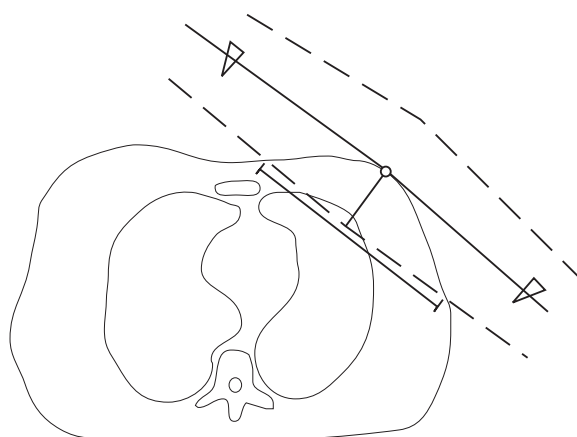
angepasste Therapieschemata  
aus Pfeleiderer A.: Gynäkologie und Geburtshilfe,  
Georg Thieme Verlag (2001)

Der Tumor soll erstens operativ vollständig und im Gesunden (in toto et in sano) entfernt werden und die Tumorexstirpation zweitens in der Regel mit einer axillaren Lymphadenektomie (Ausräumung der Achsellymphknoten) verbunden sein. Diese hat zum Ziel, mit Zahl und Größe der befallenen axillaren Lymphknoten die Indikation für eine nachfolgende Therapie festzulegen und die Rezidivrate in der Axilla niedrig zu halten. Etwa bei der Hälfte aller Patientinnen treten innerhalb von 10 Jahren Fernmetastasen auf, die nur noch palliativ (symptomatisch) behandelt werden können. Die Häufigkeit einer Metastasierung ist am Befall der axillaren Lymphknoten ablesbar – sie ist insbesondere dann hoch, wenn mehr als 3 Lymphknoten befallen sind.

#### 4 1.3.2 Adjuvante Strahlentherapie

Die Strahlenbehandlung im Rahmen der Primärtherapie umfasst die Brust und in Abhängigkeit vom N-Status die regionalen Lymphknoten. Die Brustdrüse wird über isozentrische tangentielle Gegenfelder, die um  $180^\circ$ , bei Divergenzausgleich um  $185^\circ$  gegeneinander versetzt sind, bestrahlt. Als empfohlene Dosis sind 50 Gy in 5 Wochen (Fraktionierung in der Regel  $5 \times 2$  Gy wöchentlich) nach vollständiger Exstirpation und Boostdosen von  $5 \times 2$  Gy auf das Tumorbett üblich. Durch die adjuvante Strahlenbehandlung kann, wie Scherer und Sack (1996), S. 665 bzw. 673 ff., anmerken, die Rate lokoregionaler Rezidive von Tumoren im pT1-Stadium auf weniger als 10 % abgesenkt und somit die Prognose der betroffenen Patientinnen deutlich verbessert werden. Zu Bedenken gilt es, dass die Notwendigkeit der oben genannten Boostbestrahlung des ehemaligen Tumorbettes im Rahmen einer Strahlentherapie nach brusterhaltender Operation kontrovers diskutiert wird. Einige Autoren empfehlen die Beibehaltung einer lokalen Dosiserhöhung zur Verminderung des Risikos eines Lokalrezidivs. So wurde in einer randomisierten Studie von Romestaining et al. (1997) eine signifikant geringere Anzahl von Lokalrezidiven bei Patientinnen mit Boostbestrahlung, verglichen mit einer Kontrollgruppe ohne lokalen Dosisboost, nachgewiesen.

Demgegenüber konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass sich bei Patientinnen mit histologisch sicher tumorfreien Resektaträndern durch eine homogene Bestrahlung der gesamten Brust ohne lokalen Boost die Rezidivrate vergleichbar nied-



#### Bestrahlungstechnik

isozentrische, tangentielle Gegenfeldbestrahlung;  
aus Scherer E. und Sack H.: Strahlentherapie,  
Springer-Verlag 3. Auflage, S. 662 ff.

Abbildung 1.1



rig halten lässt. Darüber hinaus beobachteten Bayerl et al. (2001), dass kosmetische Beeinträchtigungen insbesondere im Bereich der Boostapplikation auftreten. In der Klinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg wird ein lokaler Elektronenboost mit  $5 \times 2$  Gy appliziert.

### 1.3.3 Adjuvante und neoadjuvante Chemo-/Hormontherapie

In Abhängigkeit der Tumorhistologie (Grading) des Lymphknotenstatus (pN-Status) und des Hormonrezeptorstatus findet eine systemische, adjuvante Chemotherapie oder Hormontherapie Anwendung. Doch ist bei der multimodalen Therapie sowohl der Therapiezeitpunkt, als auch das verwendete Therapieprotokoll uneinheitlich beschrieben und werden verschiedene Meinungen kontrovers diskutiert. Zusammenfassend kann bei prämenopausalen Patientinnen mit nachgewiesenen axillaren Lymphknotenmetastasen die adjuvante Zytostatikatherapie heute als Standardtherapie gelten. Das Protokoll der 1. Wahl sind 6 Zyklen CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluoruracil). Bei postmenopausalen Patientinnen mit nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen und positivem Hormonrezeptorstatus kann eine adjuvante Hormontherapie (Tamoxifen) als Standardbehandlung bezeichnet werden (Verweis auf weiterführende Literatur, z. B. Baltzer et al.: Praxis der gynäkologischen Onkologie, 2. Auflage (2000), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York).

5

## 1.4 Komplikationen der Strahlentherapie

Neben den Komplikationen des chirurgischen Eingriffs und der eventuell anschließenden Chemo-/Hormontherapie kann es im Rahmen der Strahlenbehandlung bei bestimmten Patientinnen zu Intoleranzreaktionen des gesunden Gewebes



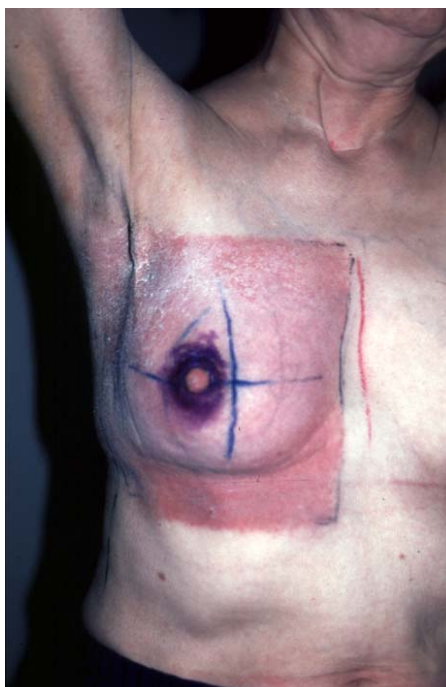
kommen, die sich als akute Strahleneffekte (acute effects) oder spätere Reaktionen, (late effects) der Haut oder anderer Organe zeigen können. Allgemein erstrecken sich akute Strahlenschäden als Nebenwirkungen einer Strahlentherapie über ein Spektrum von einfachen Hautreaktionen (Rötung, Erwärmung) über Ulzerationen bis hin zur Nekrose. Speziell als typische Spätfolgen der Strahlentherapie im Rahmen der brusterhaltenden Therapie beschreibt Sauer et al. (1989) die schwere Fibrose der Brust (2–5%), ei-

**Abbildung 1.2**

**Brustfibrose** – nach Bestrahlung bei einer Patientin im Rahmen der brusterhaltenden Therapie; Foto: Dr. U. Oppitz

6

ne schmerzhafte Myositis der Brustmuskulatur (bis 5%), Armödeme (1–9%), Hautnekrosen (1–2%), Radionekrosen der Rippen (1–4%), eine Strahlenpneumonitis (2–4%), Armplexusläsionen (1%), Pleuraergüsse (1%) und Perikardfibrose (1%) als Auftretensrate in Prozent. Scherer et al. (1996), S. 677–678, fügen ergänzend hinzu, dass bei der heute etablierten Technik diese Werte nicht mehr zu erwarten sind. Doch werden nicht alle Patienten gleichermaßen von Nebenwirkungen getroffen, sondern ist die Strahlensensibilität innerhalb des Kollektivs uneinheitlich – d.h. es besteht eine interindividuell unterschiedliche Toleranz gegenüber ionisierender Strahlung. Untersuchungen haben gezeigt, dass hierbei genetischen Komponenten eine wichtige Rolle zukommt. Insbesondere die gewonnenen Erkenntnisse an Patienten mit Fanconi-Anämie oder Bloom-Syndrom, die eine gesteigerte Nebenwirkungsrate nach einer Strahlentherapie aufzeigen, untermauern diese Annahme. Besonders dramatische Reaktionen infolge einer Strahlenbehandlung finden sich bei Hart et al. (1987), Abadir et al. (1983), Thacker et al. (1994) und Gatti et al. (1991) für Tumorpatienten, die an einer Ataxia teleangiectasia erkrankt waren. In einzelnen Fällen



**Strahlenerithem** – nach Bestrahlung bei einer Patientin im Rahmen der brusterhaltenden Therapie; Foto: Dr.U. Oppitz

**Abbildung 1.3**

organ / tissue	grade 1	grade 2	grade 3	grade 4
<b>skin</b>	follicular, faint or dull erythema, epilation, dry desquamation, decreased sweating	tender or bright erythema, patchy moist desquamation, moderate edema	confluent, moist desquamation other than skin folds, pitting edema	ulceration, hemorrhage, necrosis
<b>lung</b>	mild symptoms of dry cough or dyspnea on exertion	persistent cough requiring narcotic, antitussive agents; dyspnea with minimal effort but not at rest	severe cough unresponsive to narcotic antitussive agent or dyspnea at rest; clinical or radiologic evidence of acute pneumonitis; intermittent O <sub>2</sub> or steroids may be required	severe respiratory insufficiency; continuous oxygen or assisted ventilation

**Einteilung der Akutreaktionen – Originaltabelle**

*Acute Radiation Morbidity Scoring Criteria (RTOG)*, aus Perez C.A.: Principles and Practice of Radiation Oncology, 3. Auflage (1997)

**Tabelle 1.3**

fürten die akut auftretenden Strahlenschäden zum Tod der Patienten, wie Cunliffe et al. (1975), Gotoff et al. (1967) und Morgan et al. (1968) beschreiben.

Im Falle der Bestrahlung von Patientinnen, die an einem Mammakarzinom erkrankt sind, stellt die großflächige Fibrose der Brust einen massiven Späteffekt dar (vgl. Abb. 1.3). Es steht nun zentral im Interesse des Strahlentherapeuten, strahlensensible Patienten im Vorfeld einer indizierten Strahlenbehandlung erkennen zu können, um somit sowohl akute als auch später auftretenden Nebenwirkungen zu minimieren. Hierbei wäre es wünschenswert, durch vorangehende in-vitro- oder in-vivo-Testverfahren, das Risiko einer erhöhten Strahlensensibilität möglichst genau einschätzen zu können.

organ/tissue	grade 1	grade 2	grade 3	grade 4	grade 5
skin	slight atrophy, pigmentation change, some hair loss	patchy atrophy, moderate telangiectasia, total hair loss	marked atrophy, gross telangiectasia	ulceration	death directly related to radiation late effect
subcutaneous tissue	slight duration (fibrosis) and loss of cutaneous fat	moderate fibrosis but asymptomatic, slight field contracture <10% linear reduction	severe induration and loss of subcutaneous tissue, field contracture >10% linear measurement	necrosis	
lung	asymptomatic or mild symptoms (dry cough), Slight radiographic appearance	moderate symptomatic fibrosis or pneumonitis (sever cough), low-grade fever, patchy radiographic changes	severe symptomatic fibrosis or pneumonitis, dense radiographic changes	severe respiratory insufficiency, continuous O <sub>2</sub> , assistes ventilation	

**Tabelle 1.4**

**Einteilung der Spätreaktionen – Originaltabelle**

*Late Radiation Morbidity Scoring Scheme (RTOG, EORTC), aus Perez C.A.: Principles and Practice of Radiation Oncology, 3. Auflage (1997)*

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll in einem in-vitro-Modellsystem an humanen Lymphozyten (Patientenblut) und Fibroblasten (Hautbiopsie) untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen der Mikrokernfrequenz (als Parameter irreparabler DNA-Schädigung infolge ionisierender Strahlung; s. u.) im Vergleich zu einander und dem klinischen Verlauf bezüglich erhöhter Strahlensensibilität und den damit verbundenen Nebenwirkungen besteht. Fernes Ziel dieser Arbeit und weiterer Ergebnisse stellt die Entwicklung eines prädiktiven Testsystems zur Optimierung und Individualisierung einer strahlentherapeutischer Behandlung dar.

8

## 1.6 Einleitende Bemerkungen zu (in vitro) Zellkulturen und Modellvorstellungen

Vom Tier aber auch vom Menschen entnommene Zellen lassen sich für bestimmte Zeit in geeigneten Medien kultivieren. Diese sogenannten Primärzellen können nur eine begrenzte Anzahl an Zellteilungen (Mitosen) durchlaufen. Die Anzahl der Zellteilungen ist abhängig von der Zellart, der Tierspezies und dem Lebensalter des Spendertieres. Durch bestimmte (z. B. mutagene) Behandlung der Zellen entstehen manchmal Kulturen, die veränderte Charakteristika aufweisen und sich unbegrenzt zu teilen vermögen. Diese werden als Permanentzelllinien bezeichnet. Auch aus Tumorzellen lassen sich Zellkulturen etablieren, die unbegrenzt teilungsfähig sind.

Zelllinien werden in zwei Kategorien eingeteilt: (I) adhärenente Zellen, d. h. in Monolayern wachsende Zellen und (II) nichtadhärenente Zellen, die als Suspension kultiviert werden. Die Fähigkeit sich zu teilen ist ein Charakteristikum proliferierender Zellen. Doch nur ein Teil der Zellen eines Gewebes teilt sich. Dieser Teil wird als Wachstumsfraktion bezeichnet. Sie wird dem nichtproliferativen Kompartiment, also den Zellen, die nicht den Zellzyklus durchlaufen, gegenübergestellt. Zellen im nichtproliferativen Kompartiment sind überwiegend in der  $G_0$ -Phase, aus der sie nur unter bestimmten Umständen wieder in die Wachstumsfraktion zurückkehren (Recruitment). In diesem Zustand befinden sich beispielsweise die meisten ausdifferenzierten Gewebezellen. Beispiele hierfür finden sich in der Erneuerung von Lebergewebe nach partieller Hepatektomie, die Antwort ruhender normaler Lymphozyten auf Mitogene und die Reaktion von in Kultur wachsenden Zellen auf ein Nährstoffangebot.

## 1.7 Wachstumsverhalten einzelner Zellen – Zellzyklus

Im Zellzyklus wird zweckmäßigerweise zwischen Chromosomenzyklus und dem parallel verlaufenden zytoplasmatischen Zyklus unterschieden. Im Chromosomenzyklus

wechseln zwei Vorgänge ab: Die DNA-Synthese, in deren Verlauf sich die DNA im Zellkern verdoppelt und die Mitose, die für die Trennung der verdoppelten Genomkopien sorgt. Der zytoplasmatische Zyklus besteht aus dem Zellwachstum, also der mengenmäßigen Verdopplung der vielen anderen Zellbestandteile und der Zytokinese, die zur gesamten Teilung der Zelle führt.

Der Chromosomenzyklus (und damit die Wachstumsfraktion) wird gemäß den Untersuchungen von Howard et Pelc (1953) herkömmlich in vier Phasen unterteilt:

- (1) die G<sub>1</sub>-Phase (G=Gap; Lücke), die die eigentliche Wachstumsphase der Zelle darstellt,
- (2) die S-Phase (S=Synthese), bei der es zur Replikation und damit Verdoppelung der genomischen DNA kommt und
- (3) die G<sub>2</sub>-Phase als Vorbereitungsphase für die sich anschließende
- (4) M-Phase (M=Mitose), an deren Ende die Entstehung von zwei Tochterzellen steht, die nun ihrerseits wieder den Zellzyklus durchlaufen können.

Phase	DNA	Funktion
<b>G<sub>1</sub></b>	2n	– Zellwachstum – Biosynthese
<b>S</b>	2n – 4n	– DNA-Synthese – Zentriolenverdopplung – Histonen-Synthese
<b>G<sub>2</sub></b>	4n	– Kontroll-Reparatur-Phase
<b>M</b>	Prophase	– Chromosomen-Kondensation – Auflösung des Nukleolus – Verschiebung der Zentriolen in Richtung der Zellpole
	Prometaphase	– Ausbildung des Kinetochor-Spindelapparat
	Metaphase	– Orientierung der Chromosomen in Äquatorialebene
	Anaphase	– Verschiebung der Chromatiden zu den Zellpolen
	Telophase	– Kernmembranbildung – Dekondensation des Chromatins
	Zytokinese	– Zellteilung unter Verteilung der Organellen zu gleichen Teilen
<b>G<sub>0</sub></b>	2n	– ruhende Zelle

**Tabelle 1.5**

**Zellzyklus mit Mitosephasen**

aus Hirsch-Kauffmann: Biologie für Mediziner; Georg-Thieme-Verlag Stuttgart, 2. Auflage (1992) S. 59ff. und Benninghoff: Anatomie; Urban & Schwarzenberg, 15. Auflage (1994) Band I, S. 85ff.

Die Phasen 1–3 werden auch als Interphase bezeichnet. Innerhalb der Zellen, je nach ihrer Phasenzugehörigkeit im Zellzyklus, findet sich eine charakteristische Verteilung des DNA-Gehalts, die mittels Durchflusszytometrie (s. u.) messbar ist. Der Zeitraum, innerhalb dessen alle Zellen den Zellzyklus zwischen zwei Mitosen durchlaufen haben, wird Generationszeit genannt. In dieser liegen die proliferierenden Zellen entsprechend der Dauer der einzelnen Zyklusphasen statistisch verteilt vor. Die Bestimmung der Zellzykluszeiten hat gezeigt, dass insbesondere die G<sub>1</sub>-Phase eine große Variationsbreite hat. Sie kann (z. B. beim jungen Froschembryo) praktisch ganz entfallen, oder aber sie kann so lang sein, dass die Zelle völlig zu ruhen und damit keinen Vermehrungszyklus mehr zu durchlaufen scheint (z. B. adulte Hepatozyten in vivo).

Eine solche G<sub>1</sub>-Phase bezeichnet man, wie oben bereits beschrieben, oft auch als G<sub>0</sub>-Phase oder nichtproliferatives Kompartiment; vgl. auch Alberts (1995) S. 870. Dagegen sind die S-, G<sub>2</sub>- und M-Phasen von Säugetierzellen offenbar relativ konstant, wobei die S-Phase die längste und die M-Phase die kürzeste Zeitdauer hat; Scherer et Sack (1996), S. 118. Doch hängt die

Wachstumsgeschwindigkeit eines Gewebes insgesamt weniger von der Generationszeit als vor allem von der Größe der Wachstumsfraktion (relativ zum nichtproliferativen Kompartiment) ab; Forth et al. (1996), S. 801f.

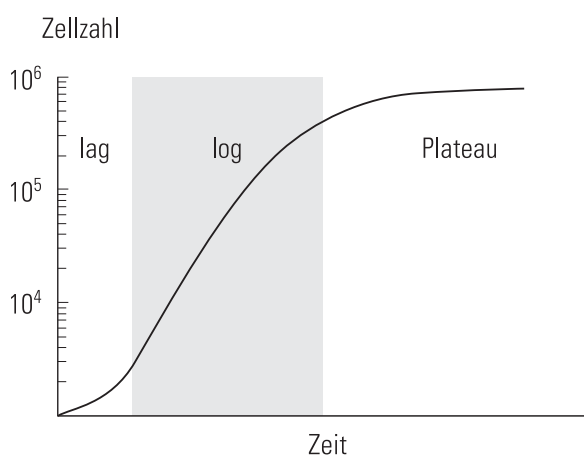
Um sich das quantitative Verteilungsmuster der Wachstumsfraktion in einem nicht-synchronisierten Zellzyklus leichter vorstellen zu können, kann das von Bagwell (1993) benutzte Modell hilfreich sein (vgl. Anhang). Überträgt man dieses Modell auf den Zellzyklus, so kommt man zu der Aussage, dass die Verteilung der Zellen gemäß ihres relativen Zellalters einer abnehmenden Exponentialfunktion folgt.

10

### 1.8 Wachstumsverhalten von Zellen als Gewebe – Wachstumszyklus eines Gewebes

Der Wachstumszyklus eines Gewebes in vitro wird klassischerweise, z. B. bei Freshney (1987), in drei Phasen unterteilt: (1) Unter der lag-Phase versteht man die Zeit nach Aussaat der Zellen in die Kultur, in der nur ein geringes Ansteigen der Zellzahl nachweisbar ist. Es ist ein Zeitraum der Anpassung von Zellen an die neuen Bedingungen. (2) Die log-Phase ist der Zeitraum mit exponentiellem Anstieg der Zellzahl, die der Anpassungsphase folgt. Die Länge der log-Phase ist abhängig von der Aussaatdichte, der Wachstumsrate der Zellen und der Zelldichte, bei der das Wachstum durch diese selbst gehemmt wird. In der log-Phase befindet sich die Kultur in ihrer reproduktivsten Form und die Wachstumsfraktion liegt bei 90–100 %. Weiter weist die Population ihre höchste Uniformität auf, d. h.

die Relation Wachstumsfraktion versus nichtproliferatives Kompartiment hat ihre höchste Konstanz bzw. Unterschiede in der Dauer des Teilungszyklus der Zellen an sich zeigen die höchste Konstanz. Mathematisch (idealisiert) lässt sich das exponentielle Wachstum folgendermaßen beschreiben:



#### Wachstumsphasen eines Gewebes

gemäß klassischer Einteilung, z. B. aus Freshney R.I.: Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique; Alan R. Liss 2nd Edition

Abbildung 1.4

$$N = N_0 \cdot e^{\left(\frac{t}{t_d}\right) \cdot \ln 2}$$

Formel 6.1

Diese Beziehung folgt der Frage, wieviel Zellen ( $dN$ ) pro Zeiteinheit ( $dt$ ) zu den bereits vorhandenen Zellen ( $N$ ) hinzukommen (Herleitung vgl. Anhang). Die log-Phase endet bei adhärennten Primärzellen mit dem Erreichen der Konfluenz im Sinne einer Kontaktinhibition, d. h. die Zellzwischenräume haben einen minimalen Abstand erreicht, der es den Zellen nicht mehr zulässt, sich weiter zu teilen, bzw. der Anteil von Zellen, die einen sehr langsames Wachstumsverhalten zeigen, zunimmt, bis schließlich die Plateau-Phase erreicht ist, in der (3) die Wachstumsrate der Kultur reduziert ist und die Wachstumsfaktion auf 0–10 % fällt bzw. der Anteil der sich rasch teilenden Zellen sehr klein wird. Abgesehen von der oben erwähnten Kontaktinhibition können auch andere Faktoren den Übergang in die Plateau-Phase einleiten, wie z. B. ein Rückgang von Nährstoffen oder Wachstumsfaktoren. Innerhalb der Plateau-Phase findet lediglich das Ersetzen von absterbenden Zellen im Sinne eines Erhaltungswachstums statt, dessen Endlichkeit von Zelltyp, den Kulturbedingungen und dem Gewebealter abhängt und dann mit der Absterbephase endet.

11

### 1.9 Störung der Zellvermehrung nach Bestrahlung, Scherer et Sack (1996)

Wird eine proliferierende Zellpopulation ionisierender Strahlung ausgesetzt, so beobachtet man als ersten Strahleneffekt eine Abnahme der Mitoserate. Die Latenz, die Größe und die Dauer, mit der diese Strahlenwirkung auftritt, ist von der Strahlendosis abhängig. Die reversible Abnahme der Mitoserate führt u. a. zu einer zeitlichen Verlängerung des Generationszyklus. Untersuchungen von Puck et Steffen (1963)<sup>1</sup> sowie Walters et Petersen (1968)<sup>1</sup> ergaben, dass Zellen, die zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der  $G_2$ -Phase des Generationszyklus bereits weiter fortgeschritten sind, unmittelbar in die Mitose eintreten, während solche Zellen, die vor diesem kritischen Punkt bestrahlt werden, in Abhängigkeit von der Strahlendosis für eine gewisse Zeit aufgehalten werden. Dieser sog.  $G_2$ -Block kann als eine Phase der Erholung angesehen werden, in der Zeit gewonnen wird, um Strahlenschäden vor der nächsten Mitose zu reparieren. Molekularbiologisch lässt sich diese Beobachtung anhand der Wirkungsweise ionisierender Strahlung erklären: in den Zellen, die der ionisierenden Strahlung ausgesetzt waren, sind Proteine, Membranen oder die DNA (Träger der Erbinformation) entweder direkt durch die Strahlung selber oder indirekt, infolge der durch die Strahlung entstandenen reaktiven Sauerstoffradikalen, geschädigt worden. Mit zunehmender Strahlendosis treten in verstärktem Maße irreversible Schäden auf, die zu anomalen Teilungsprozessen oder Zytolyse führen. Die Zahl der Teilungen, die die geschädigte Zelle durchläuft, bevor der Strahlenschaden (Zelltod) manifest wird, ist ebenfalls von der Strahlendosis abhängig. Marnett (2000) unterscheidet daher drei verschiedene Phänomene der Strahlenwirkung:

(1) die Mitoseverzögerung durch das Arretieren von Zellen im Zellzyklus zur Repa-

<sup>1</sup> Zitat aus Originalliteratur; Autoren bzw. Textstellen finden sich nicht im Literaturverzeichnis; Verweis auf Scherer et Sack (1996)

ratur entstandener DNA-Schäden,

(2) den programmierten Zelltod (Apoptose) als Folge der unzureichenden Reparaturkapazität der Zellen und

(3) das Wiedereintreten der noch geschädigten Zellen nach unvollständiger Reparatur als mutierter Zellklon bis hin zur neoplastische Transformation der Zellen.

Schnell proliferierende Zellen gehen im allgemeinen nach 2–4 Tagen zugrunde oder verlieren ihre Fähigkeit, Tochterzellen bzw. Kolonien zu bilden (reproductive death). Bei höheren Strahlendosen (mehrere 10 Gy) tritt der Zelltod ein, ohne dass eine Mitose begonnen oder durchlaufen wurde (Interphasetod). Bei Lymphozyten tritt dieser Interphasetod bereits nach Bestrahlung mit 1 Gy ein. Sowohl das therapeutische Ziel als auch die wenig erwünschten Nebenwirkungen einer Strahlentherapie liegen diesem Wirkungsmechanismus zugrunde.

12

Doch abgesehen von Höhe und Dauer der Einwirkung ionisierender Strahlung auf biologische Systeme ist der Zustand des biologischen Systems selbst mitverantwortlich für die Wirkung der Bestrahlung. Insbesondere der verschiedenen Phasen im Zellzyklus kommt eine große Bedeutung für die Strahlenempfindlichkeit der Zellen zu. Für die Strahlenempfindlichkeit von proliferierenden Säugetierzellen in Abhängigkeit von der Phase des Generationszyklus scheinen folgende Grundsätze zu gelten, wenn die Überlebensrate (Reproduktivität) der Zellen nach Bestrahlung gemessen wird:

(1) Zellen, die während der Mitose bestrahlt werden, sind am empfindlichsten

(2) Im allgemeinen sind die Zellen auch während der frühen S-Phase und während der G<sub>2</sub>-Phase strahlenempfindlich

(3) Im Laufe des S-Phase steigt die Strahlenresistenz der Zellen an

(4) Wenn die G<sub>1</sub>-Phase lang ist, sind die Zellen während der frühen G<sub>1</sub>-Phase relativ resistent. Gegen Ende der G<sub>1</sub>-Phase nimmt die Strahlenempfindlichkeit zu

Das Wissen dieser Eigenschaften als Antwortverhalten biologischer Systeme auf ionisierende Strahlung ist sowohl für die therapeutische Anwendung einer Strahlentherapie als auch für in-vitro-Testverfahren bedeutungsvoll.

### 1.10 Verwendetes Testsystem – der Mikrokerntest (MN-Assay)

Vom Zellkern losgelöste, eigenständige Chromatinteilchen, die im Zytoplasma von proliferierenden Zellen nach Exposition mit ionisierender Strahlung oder Behandlung mit mutagenisierenden Substanzen auftreten, werden Mikrokerne (MN) genannt (Schmid et al. 1975, 1996, Heddle 1973, Kaffenberger et al. 1990). Von ihnen wird angenommen, dass sie aus Chromatinfragmenten, azentrischen Chromosomen oder kompletten Chromosomen, die nicht vollständig während der Mitose in die Tochterzellen aufgenommen wurden, gebildet werden (Heddle 1973, Kaffenberger



et al. 1990). Sie können als kleine extranukleäre Körperchen in Interphase-Zellen gefunden werden (Johannsen et al. 1998, Streffer et al. 1986). Es wird bei diesem Vorgang von einem passivem Prozess ausgegangen, d. h. um Chromosomen(fragmente), die während der Mitose nicht in die Kerne der Tochterzellen integriert wurden, bildet

sich eine separate Kernmembran (Schiffmann et al. 1991). Nach Anfärbung erscheinen die Mikrokerne floureszenzmikroskopisch als unterschiedlich große (bis zu 1/3 des Zellkerndurchmessers), oval-runde Strukturen im Zytoplasma.

Die Induktion von Mikrokerneln kann durch unterschiedliche Veränderung des genetischen Materials ausgelöst werden. Es können zum einen direkte DNA-Schäden sein, die als Folge Chromosomenaberrationen hervorrufen (Schmuck et al. 1988) oder zum anderen Störungen des Ablaufs der Mitose (Tucker 1996).

Über das weitere Schicksal der MN-aufweisenden Zellen gibt es keine letztlich Gewissheit, doch wird von ihnen angenommen, dass sie ihre Teilungsfähigkeit verloren haben (Grote 1981, 377–394, 395–408). Andere Möglichkeiten, wie eine Reintegration der Mikrokerne in den Hauptkern oder die Entstehung von Mikrokerntragenden Tochterzellen bei erhaltener Teilungsfähigkeit sind zwar theoretisch denkbar,

aber nicht wissenschaftlich beschrieben. Stopper et al. (1997) weisen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass diese Form der Reintegration im Falle des Beinhaltens von ganzen Chromosomen in den Mikrokerneln bei synchronisierter DNA-Synthese, wie von Gustavino et al. (1994) vorgeschlagen wurde, möglich zu sein scheint. Die Fähigkeit der DNA-Synthese innerhalb der Mikrokerne wird von mehreren Autoren beschrieben: Das (1962), Kato et Sandberg (1968) und von Kramer et al. (1990).

Mikrokerne treten in den Zellen verschiedenster Organismen aber auch spontan auf. Diese Spontanrate nimmt mit zunehmendem Alter des Organismus bzw. des Gewebes zu (Fenech 1993). Eine effektive Zunahme von mikrokerntragenden Zellen

Mikrokerne – Mikronukleoli	
Abkürzung	MN (pl.: MNi)
Form	oval-runde Struktur
Größe	maximal 1/3 des Durchmessers des Hauptkernes (der Hauptkerne)
Anfärbbarkeit	maximales Ausmaß vergleichbar des Hauptkernes (der Hauptkerne)
Lage	innerhalb zytoplasmatischer Grenzen und ohne Verbindung zum Hauptkern (der Hauptkerne)
Bedeutung	Maß für genotoxischem oder strahleninduziertem DNA-Schaden

Tabelle 1.6

**Mikrokerne – Übersicht**

Zusammenfassung der Eigenschaften, aus den im Text genannten Quellen

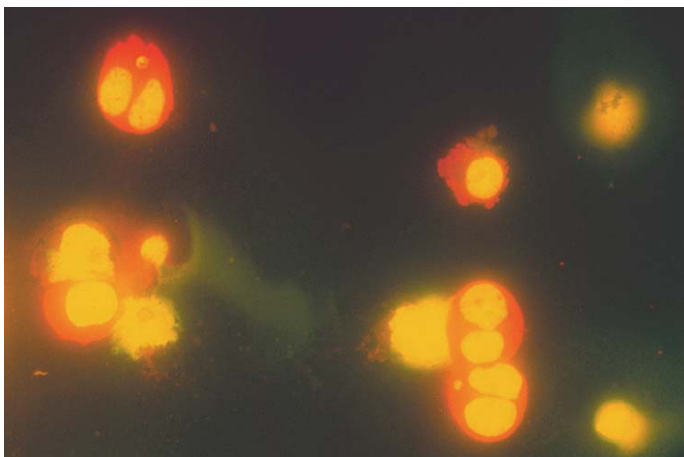


Abbildung 1.5

**lymphozytäre Mikrokerne**

erhalten durch die *Cytokinesis-block-method* und anschließender Acridin-Orange-Färbung (400fache Vergrößerung); Foto: M. Müller

durch exogene Belastungsfaktoren (z. B. intensives Sporttraining, Schiffli et al. 1997), Behandlung mit genotoxischen Substanzen oder Exposition mit ionisierender Strahlung ist bewiesen. Es liegt deshalb nahe, Testsysteme, die die Mikrokernfrequenz analysieren, zur Beurteilung der Genotoxizität von Substanzen oder der Auswirkung ionisierender Strahlung zu entwickeln und zu verwenden (vgl. dazu: Heddle 1973, Schmid 1975, 1976, Kaffenberger et al. 1990, Fenech 1986, 1993).

### 1.11 Problem des Testsystems

14 Die alleinige Bestimmung der Mikrokernfrequenzen (Anzahl von MN-tragenden Zellen auf z. B. 1000 gezählte Zellen) als Test-Parameter birgt einen entscheidenden Nachteil: Voraussetzung, um Mikrokern aufweisen zu können, ist, dass geschädigte Zellen sich (mindestens einmal) teilen müssen.

Unter vereinfachten Annahmen lässt sich das Auftreten von Mikrokernen nach einem einmaligen MN-verursachendem Ereignis durch folgendes Modell abbilden (vgl. Abb. 1.6, S. 15), in dem das exponentielle Wachstum des Gewebes, der Zeitpunkt des Auftretens von Mikrokernen und deren Verhältnis zur gesamten Zellzahl gleichermaßen (idealisiert) beschrieben wird. Für dieses Modell sollen verschiedene Annahmen (Tabelle 1.7) gelten, die einige Einflussfaktoren des realen Systems vernachlässigen (Idealisierung). Die Ausformulierung wurde in Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. (BA) Dipl.-Des. Martin Müller erarbeitet.

Für alle Zellen gelte die einleitend genannte Wachstumsfunktion (Herleitung im Anhang). Innerhalb des Zeitraumes von 0 bis 1 ( $1 \times$  Generationszeit) wachsen die Zellen auf das Doppelte ihres Ursprungwertes an. Zum Zeitpunkt 1 findet das MN-verursachende Ereignis statt (Pfeil). Exemplarisch soll hierbei jede zweite Zelle geschädigt werden (weitere Annahme 10), doch wird nur eine Tochterzelle nach der anschließenden Mitose einen MN aufweisen. Diese nimmt dann im Gegensatz zu ihrer Zwillingsschwester nicht mehr am Gewebewachstum teil (gemäß Annahme 7). Im Zeitraum 1 bis 2 wächst die Zahl der MN-tragenden Zellen exponentiell bis zu ihrem Maximalwert von 25 % (Ergebnis aus Annahme 10) der Zellzahl der gesamten Wachstumsfraktion an. Im weiteren Verlauf bleibt diese Anzahl konstant (gemäß Annahme 7–9; unterbrochene Linie in Abb. 1.6. Die Gesamtzahl der Zellen ist bis zum

Annahmen des Gedankenmodells	
Annahme 1	Population gleicher Zellen in einem unendlichen (optimalen) Milieu
Annahme 2	keine Zellverluste während des Wachstums
Annahme 3	alle sich teilende Zellen weisen eine ähnlich große Zellverdopplungszeit (Generationszeit) $t_d$ auf
Annahme 4	kein Recruitment
Annahme 5	keine MN-Spontanrate, d. h. alle MN sind Folge des MN-verursachenden Ereignisses
Annahme 6	alle MN zeigen sich in der nächsten Mitose
Annahme 7	MN-tragende Zellen können sich nicht weiter teilen
Annahme 8	MN können nicht wieder in den Zellkern integriert werden
Annahme 9	MN-tragende Zellen sterben nicht ab und bleiben für die Zeit der Betrachtung nachweisbar

**Tabelle 1.7**

Zeitpunkt 2 auf bis das annähernd 4-fache ihres ursprünglichen Wertes angewachsen. Nach diesem Zeitpunkt wächst ihre Anzahl weiter exponentiell an, allerdings fallen die MN-tragenden Zellen im weiteren aus, so dass eine Zellzahl  $N_2$  als weitere Ausgangszellzahl angenommen werden muss (Knick in der Kurve zum Zeitpunkt 2).

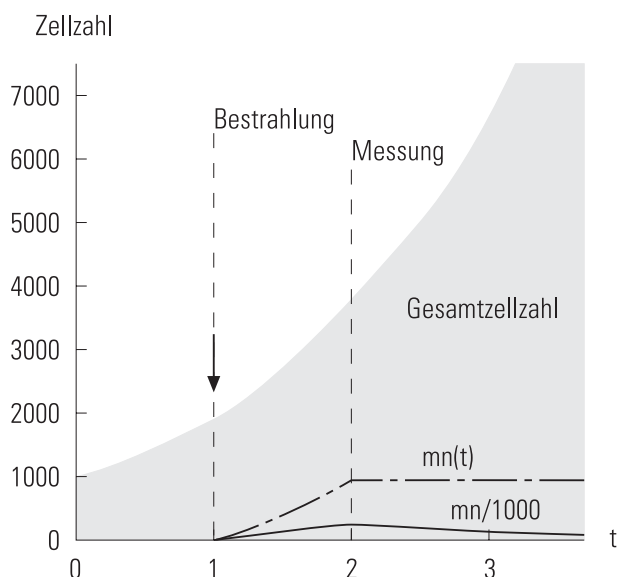


Abbildung 1.6

**Wachstumsmodell**

Gesamtzahl = graue Fläche;  $mn(t)$  = maximale MN-Anzahl (unterbrochene Linie);  $mn/1000$  = MN-Frequenz; Zeitpunkt 0 = Aussaat; Zeitpunkt 1 = Bestrahlung; Zeitpunkt 2 = Messung

Die Zellzahl  $N_2$  entspricht dem 3-fachen der Anfangszellzahl  $N_0$  zu Beginn des Experiments. Betrachtet man nun den Anteil an MN-tragenden Zellen ( $mn/1000$ ) bezogen auf die Gesamtzahl, so ist leicht einzusehen, dass die rasant ansteigende Zellzahl dieses Verhältnis schnell um ein Vielfaches verkleinert. Dies liegt an der konstanten Zahl von MN in Bezug auf die exponentiell wachsende Gesamtzellzahl. Da in der Praxis die Messung aber immer zum selben Zeitpunkt stattfindet, werden Ergebnisse an unterschiedlich »alten« Geweben gewonnen und miteinander verglichen. Tabelle 1.8 (S. 16) zeigt diesen Vergleich an drei Individuen (Typ a, b, c) mit selber Empfindlichkeit bezüglich des MN-verursachenden Ereignisses (gleichhohe maximale MN-Frequenz

nach einer Generationszeit) aber unterschiedlich langen Generationszeiten, wobei die vom Typ a das 0,5-fache und die vom Typ c das 2-fache des »normierten« Typs b beträgt. Bei einer (willkürlich) angenommenen Messung zum Zeitpunkt 2, zeigt Typ b seine maximale MN-Frequenz, Typ a hingegen nur 90 % der MN-Frequenz von Typ c auf. Oder bezogen auf den »normierten« Typ b, zeigt Typ a 60 % und Typ c 54 % der MN-Frequenz von Typ b. Geht man nun von einer Korrelation von Ereignissensibilität und MN-Frequenz aus und lässt das Wissen der unterschiedlichen Generationszeiten außer acht, kommt man in konsequenter Folge auf die Behauptungen, dass Typ b empfindlicher, hingegen Typ a und c unempfindlicher als Typ b ist – eine Behauptung, die den tatsächlichen Zustand in keiner Weise richtig beschreibt.

Bei diesem bisherigen Modell setzte man stillschweigend ein interindividuell konstantes nichtproliferatives Kompartiment ( $G_0$ ) voraus. Da jedoch die MN-Frequenz als Verhältnis der MN-tragenden Zellen zur Anzahl der gezählten Zellen definiert ist, zeigt sich, dass Veränderungen der Relation von Wachstumsfraktion und nichtproliferativem Kompartiment bei gleicher Empfindlichkeit und Generationszeit der Zellen, zu einer MN-Frequenz führt, die eine Fehldeutung der Ergebnisse zur Folge hat. Betrachten wir wiederum den »normierten« Typ b mit einer Wachstumsfraktion ( $wf$ )

von 75 % (25 %  $G_0$ ) weiter als Bezugsgröße, so zeigt ein Typ d mit einer Wachstumsfraktion von 90 % (10 %  $G_0$ ) 105 % und ein Typ e (wf 60 %, 40 %  $G_0$ ) 92 % der MN-Frequenz verglichen mit Typ b (vgl. Tabelle 1.8). Auch hierbei entspricht die Interpretation der Ergebnisse unter obiger Annahme nicht der tatsächlichen Situation. Ein ähnliches, weniger detailliert ausformuliertes Beispiel, nennt auch Fenech (Mutat Res 392 (1997) 11 – 18).

16

t	Typ a	Typ b	Typ c	Typ d	Typ e
0,0	0	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0
0,75	0	0	0	0	0
1,0	0	0	0	0	0
1,25	138	70	34	76	62
1,5	240	131	66	141	119
1,75	185	184	97	196	169
<b>2,0</b>	<b>139</b>	<b>231</b>	<b>126</b>	<b>243</b>	<b>214</b>
2,25	104	204	153	214	191
2,5	76	179	179	187	169
2,75	55	157	202	162	149
3,0	40	136	224	141	130
	Typ a	Typ b	Typ c	Typ d	Typ e
td	0,5	1	2	1	1
$G_0$	25 %	25 %	25 %	10 %	40 %
wf	75 %	75 %	75 %	90 %	60 %

Zusammenfassend lässt sich im Einklang mit Serazin et al. (1989) bzw. Gilbert et al (1993) sagen, dass wenn man Ergebnisse von Messungen an Zellen, insbesondere in Primärkulturen, miteinander vergleichen will, ist die Kenntnis über das Wachstumsverhalten der miteinander zu vergleichenden Gewebe von entscheidender Bedeutung. Bei der von Fenech et Morley 1985 an humanen Lymphozyten beschriebenen *cytokinesis block method* (CB) unter Verwendung von Cytochalasin B gelingt diese wichtige Differenzierung zwischen proliferierenden und nicht proliferierenden Zellen in bestimmten Geweben; Fenech (1985). Dieses CB-Verfahren ist wissenschaftlich anerkannt und gilt als Standard für die Durchführung des MN-Tests. Für das Gewebe der Lymphozyten wurde es im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Das von Johannsen et al. (1998) beschriebene analoge CB-Verfahren mittels Cytochalasin B an humanen Fibroblasten konnte in unserem Labor nur unzureichend nachvollzogen bzw. durchgeführt werden. So haben wir versucht, andere Parameter für die Fibroblasten-Kulturen zu finden, um das Proliferationsverhalten genauer beschreiben und die Ergebnisse damit gegebenenfalls modifizieren zu können.

**Wertetabelle**

Werte, die sich durch gemäß der Modellvorstellung unter den genannten Angaben errechnen lassen

**Tabelle 1.8**

1.12 Durchflusszytometrie mittels Propidiumjodid (PI)

Bei dieser Methode wird nach Anfärbung der DNA ihr Gehalt jeder einzelnen Zelle über die Intensität der Fluoreszenz erfasst. Durch die apparative Einrichtung können eine hohe Anzahl an Zellen pro Zeiteinheit gemessen werden, was zu einer hohen Sicherheit über die statistische Verteilung führt. Als Ergebnis erhält man ein Histogramm, das die Anzahl der Zellen, entsprechend ihrem DNA-Gehalt eingeteilt, wie-

dergibt. Da die  $G_2$ -Phase-Zellen den doppelten DNA-Gehalt der  $G_1/G_0$ -Phase-Zellen haben und der DNA-Gehalt der S-Phase-Zellen dazwischenliegt, kann aufgrund des

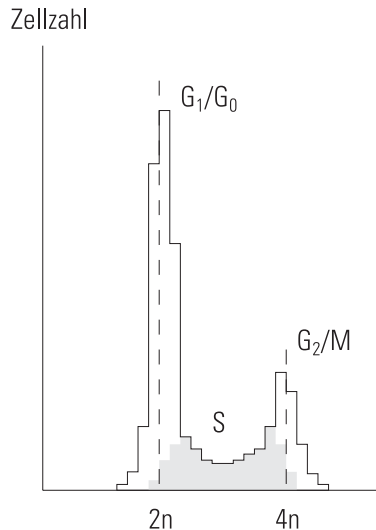


Abbildung 1.7

**Durchflusszytometrie**

Histogramm der Verteilung im Generationszyklus gemäß Fluoreszenzintensität nach PI-Anfärbung; Alberts B.: Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage (1995) S. 872

Histogramms die Verteilung der Zellen im Generationszyklus im allgemeinen durch die Annahme einer Gaußschen Verteilung der  $G_1$ - und  $G_2$ -Phase-Zellen errechnet werden; Scherer et Sack, (1996), S. 117. Die Durchflusszytometrie ist als Methode zur Messung des DNA-Gehalts und der sich damit ergebenden Verteilung der Zellen im Zellzyklus wissenschaftlich etabliert. Jedoch ist sie nicht gänzlich unproblematisch. Die Bewertung der erhaltenen DNA-Verteilungsmuster in Histogrammen ist abhängig vom verwendeten mathematischen Modell. Desweiteren ist es in der Regel nicht möglich das Fortschreiten von Zellen durch den Zellzyklus zu messen; Gilbert et al. (1993). Die Messung stellt mehr einen momentanen Querschnitt über die theoretische

Verteilung der Zellen im Zellzyklus dar. Man kann hierbei nicht zwischen sich teilenden und sich nicht teilenden Zellen unterscheiden.

Der Gedanke, der für die Verwendung der Durchflusszytometrie bei dieser Arbeit spricht, ist einen grundsätzlichen Überblick über den jeweiligen Verteilungszustand der Zellen im Zellzyklus jeder einzelnen Kultur am Ende ihrer Kulturzeit zu erhalten. Durch die damit verbundene Quantifizierung der S-Phase-Fraktion wollen wir einen Parameter bestimmen, der etwas über den proliferativen Zustand des Gewebes aussagt. Unter der Annahme, dass die S-,  $G_2$ - und M-Phasendauer interindividuell innerhalb der selben Zelltypen annähernd gleich sind, liegt eine unterschiedliche S-Fraktion bzw. S-Phasendauer zwischen zwei Patienten entweder durch einen unterschiedlich hohen prozentualen Anteil des nichtproliferativen Kompartiments oder durch eine unterschiedliche interindividuelle  $G_1$ -Phasendauer (bei angenommener konstanter  $G_2$ - und M-Phase) begründet. Geht man weiter davon aus, dass die Messung der S-Fraktion sowie die Bestimmung der Mikrokernfrequenz vor ihrem Maximum in der exponentiellen Wachstumsphase (log-Phase mit konstanter fraktioneller Verteilung der Zellen im Zyklus) der Zellkultur stattfindet, ist das Verhältnis von S-Fraktion und MN-Frequenz zu untersuchen, mit dem Ziel, einen Korrekturfaktor für die Mikrokernfrequenz ableiten zu können und somit eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Kulturen zu erreichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur – Fibroblasten

Fibroblasten (fibra, lat.: Faser) stammen aus dem Mesenchym und sind eine Vorstufe der Fibrozyten. Fibroblasten synthetisieren alle Komponenten der Fasern und der Grundsubstanz des Bindegewebes. Es handelt sich um teilungsfähige Zellen, deren Mitoserate während des Bindegewebewachstums und bei Wundheilungen gesteigert ist. Fibroblasten mit stark verminderter Syntheseleistung (Erhaltungsumsatz) werden Fibrozyten genannt; Benninghoff (1994).

Es wurden von den Patientinnen für die Fibroblastenkulturen mit einer Stanze ( $\varnothing$  3 mm) Hautbiopsien vor Beginn der Strahlenbehandlung unter aseptischen Bedingungen am Oberarm entnommen. Die Hautprobe wurde zerkleinert, rasch in Medium (mod. DMEM) gegeben und im Brutschrank angezchtet ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10 %  $\text{CO}_2$ ). Die Zellen wurden frühzeitig umgesetzt, damit sie sich stets in der exponentiellen Wachstum-

sphase befinden. Zum Umsetzen wurde das Medium aus der Flasche abgesaugt und der Zellrasen mit ca. 5 ml PBS gewaschen. Somit kann das FCS die Wirkung des anschließend zugegebenen Trypsin-EDTA-Lösung (ca. 4 ml), das zum Ablösen

mod. DMEM – Kulturmedium für Fibroblastenkultur		
DMEM	500 ml	mit 10 mg Glukose/l und L-Glutamin
FCS	50 ml	fetales Kälberserum
Pen./Strep.	5 ml	10.000 U Penicillin, 10 mg Streptomycin

**Tabelle 2.1**

der Fibroblasten dient, nicht beeinflussen. Trypsin ist ein eiweißabbauendes Enzym, das u. a. die Adhäsionsproteine der Fibroblasten abbauen kann. Dadurch wird ein Abkugeln der Zellen bewirkt, sodass diese sich vom Boden lösen können. Der Komplexbildner EDTA unterstützt diesen Vorgang, indem er den Proteinen, mit deren Hilfe sich die Zellen anheften, Kalzium- und Magnesiumionen entzieht und diese damit destabilisiert. Durch vorsichtiges Klopfen der Kulturflasche gegen eine feste Unterlage kann der Ablösevorgang beschleunigt (Kontrolle mittels Durchlichtmikroskop) und die mögliche zytotoxische Potenz des Trypsins durch Zugabe von ca. 10 ml Medium (mod. DMEM) minimiert werden. Die nun im Medium-Trypsingemisch schwimmenden Zellen wurden abpipettiert, zentrifugiert (1.200 U/min, 5 min), in reinem Medium (mod. DMEM) resuspendiert und in entsprechender Verdünnung in neue Kulturflaschen überführt. Nach 3–5 maligem Umsetzen wurden sie in 1–2 ml Einfriermedium gegeben, langsam ( $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) abgekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um eine ausreichende Zellzahl für die Durchflusszytometrie zu erhalten, wurden pro Strahlendosis jeweils 3 Kulturflaschen angezchtet. Für die Versuchsdurchführung sind die Zellen möglichst rasch aufgetaut, alsbald mit ca. 10 ml Medium (mod. DMEM) verdünnt, abzentrifugiert (1.200 U/min, 5 min), in reines Medium (mod.

DMEM) gegeben und in 5 ml Kulturflaschen mit einer Dichte von 150.000/5 ml kultiviert worden. Nach 24 h in Kultur wurden die Zellen nicht (0), mit 2 oder 4 Gy bestrahlt. Dabei befanden sich die Zellen, jeweils mit genau definiertem Abstand zur Photonenquelle (Fokus-Oberflächenabstand: 97 cm; Feldgröße 17 × 11 cm) in 5-ml-Kulturflaschen in einem Polyethylenblock mit 3 cm dicker Wandung. Die Berechnung des Dosismaximums erfolgte durch Herrn Dipl.-Phys. K. Baier (Strahlentherapie, Universität Würzburg). Nach weiterer Kulturzeit von 72 h im Brutschrank (Mediumwechsel am 2.–3. Kulturtag) wurden am 4. Kulturtag, also nach insgesamt 96 h in Kultur, die Zellen abgelöst (Trypsin-EDTA-Lösung), gezählt (Neubauer-Zählkammer, Trypanblau) und mit PBS auf eine Konzentration von 50.000 Zellen/ml eingestellt.

20

## 2.2 Zellkultur – Lymphozyten

Lymphozyten sind von pluri- bzw. unipotenten (lymphoiden) Stammzellen im Knochenmark abstammende, in Knochenmark, Lymphknoten, Thymus und Milz gebildete und hauptsächlich über die Lymphbahnen ins Blut gelangende, kleine weiße Blutkörperchen mit großem, chromatindichtem rundem Kern und wenig basophilem, meist granuliertem Zytoplasma. Lymphozyten besitzen die Fähigkeit zur Teilung. Nur 4 % der Lymphozyten des Menschen befinden sich im peripheren Blut, etwa 70 % in den Organen des lymphatischen Systems, 10 % im Knochenmark, der Rest in anderen Organen. In Abhängigkeit von Ihrer Funktion werden v. a. B-Lymphozyten (Träger der spezifischen humoralen Immunität und Vorläufer der Plasmazellen) und T-Lymphozyten (Träger der zellvermittelten Immunität) unterschieden, deren Differenzierung durch Bestimmung der Zellmarker möglich ist; Pschyrembel (1994).

<b>mod. RPMI 1640 – Kulturmedium für Lymphozyten</b>		
RPMI-1640	500 ml	mit L-Glutamin
FCS	100 ml	fetales Kälberserum
Na-Pyruvat	5 ml	100 mM
L-Glutamin	5 ml	200 mM
non-ess. AS	5 ml	nichtessentielle Aminosäuren (100X)
Pen./Strep.	5 ml	10.000 U Penicillin, 10 mg Streptomycin

**Tabelle 2.2**

Für die Lymphozyten wurden den Patientinnen periphervenöses Blut in Heparin-Plastikröhrchen abgenommen. Die Isolation der Lymphozyten aus dem Blut erfolgte mittels Histopaque-1077. Die in dem Lymphozytenring gesammelten Zellen wurden abpipettiert, mit PBS gewaschen (2 × 10 min), in Einfriermedium gegeben, langsam abgekühlt und tiefgefroren (flüssiger Stickstoff). Für die Kulturen wurden die Zellen rasch aufgetaut, mit ca. 10 ml Medium (mod. RPMI 1640) überschichtet, abzentrifugiert (1.700 U/min, 5 min), bis auf das Pellet abgesaugt, in 0,5 ml

<b>PHA-Arbeitslösung</b>		
PHA	ca. 13 mg	Phytohämagglutinin; gefriergetrocknetes Extrakt der Phaseolus vulgaris
H <sub>2</sub> O (Aqua. dest.)	10 ml	

**Tabelle 2.3**

Medium (mod. RPMI 1640) resuspendiert und gezählt (Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau). Die Zellsuspension wurde auf eine Dichte von  $5,6 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und mehrfach resuspendiert. Aus ihr wurden 180 µl entnommen und in, für

Cytochalasin-B-Arbeitslösung		
Cytochalasin-B-Stammlösung	50 µl	1 mg Cytochalasin B in 1 ml DMSO
PBS	450 ml	

Tabelle 2.4

die jeweilige Bestrahlungsdosis einzelne Platten, 0,2 ml-Mikrowells (96well Mikrotiterplatten) gegeben. Nach 2 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen nicht (0), mit 1 oder 2 Gy bestrahlt und anschließend der Kultur 10 µl der PHA-Arbeitslösung (mit 10 µl mod. RPMI 1640) zur Wachstumsstimulation zugegeben. Nach 48 h in Kultur wurden 6 µl der Cytochalasin B-Arbeitslösung (mit 6 µl mod. RPMI 1640) zugesetzt und die Zellen für weiter 24 h kultiviert.

### 2.3 Präparate für Mikrokerntest

Aus der anschließend mehrmals resuspendierten Zellsuspension wurden 100 µl entnommen. Die Zellen wurden unter Verwendung des Cytospin-Gerätes auf Objektträger zentrifugiert (1.000 U/min, 5 min) und in –20 °C kaltem Methanol (Küvetten) fixiert (mind. 2 h). Bis zur Färbung wurden die fertigen Präparate unter den selben Bedingungen aufbewahrt.

### 2.4 Durchflusszytometrie

RNase-Arbeitslösung		
RNase	50 mg	80 Kunitz-U/mg
PBS	80 ml	

Propidiumjodid-(PI)-Arbeitslösung		
PI-Stammlösung	1 mg/ml	
PBS	20 ml	1/15 M (4,61 g in 508 ml H <sub>2</sub> O)

Tabelle 2.5, 2.6

Die restlichen im PBS verbliebenen Zellen der Fibroblastenkulturen wurden abzentrifugiert (200 G) und auf eine Zellzahl von  $10^6$  Zellen/ml, davon 1 ml pro Ansatz eingestellt und weitere 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet im restlichen PBS vorsichtig resuspendiert. Bis zum Ausgangsvolumen von 1 ml wurde 70 % Ethanol (–20 °C) zugegeben und die Zellen 60 min bei 4 °C fixiert, danach mit ca. 10 ml PBS verdünnt, erneut abzentrifugiert (200 G) und bis auf 0,5 ml abgesaugt. Die Zellen wurden in den 0,5 ml resuspendiert und ihnen wurden 0,5 ml RNase mit 1 ml Propidiumjodid zugegeben, bevor sie für weitere 60 min im Dunkeln inkubiert wurden. Die Aufbewahrung bis zur Durchflusszytometrie erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.



2.5 Anfärbung und Auswertung des Mikrokerntests

Die Präparate wurden kurz vor dem Auswerten 4 min mit der Acridin-Orange-Arbeitslösung in lichtgeschützter Küvette angefärbt und dann zweimal je 5 min in separaten Küvetten mit Sørensenpuffer gewaschen. Die Lösungen in den Küvetten sollten Raumtemperatur haben. Die pufferbedeckten Objektträger müssen, um ein Eintrocknen zu verhindern, sofort mit einem Deckglas eingedeckt und ausgewertet werden. Die Präparate wurden unter blau-gefilterten Fluoreszenzlicht (BP 450–490) bei einer 400 bzw. 1.000-fachen Vergrößerung (10 × Okular; 40–100 × Objektiv) manuell ausgewertet. Es wurden pro Versuchsansatz jeweils 1000 (bei Lymphozyten nur binukleäre) Zellen gezählt. Die Mikrokernelhäufigkeit wurde für Zellen, die einen (MN 1), zwei (MN 2) oder mehr als zwei (MN >2) Mikrokerne zeigen, getrennt bestimmt.

Als Mikrokernel wurden separate Chromatinteilchen mit eigenständiger Kernmembran gewertet, die keine Verbindung zum Hauptkern (zu den Hauptkernen) zeigen und maximal ein Drittel bzw. mindestens ein Sechzehntel des Durchmessers des Hauptkerns annehmen (vgl. Einleitung). Zum Teil überlappen sie mit der Grenze zum Hauptkern, was eine eindeutige Identifikation erschweren kann.

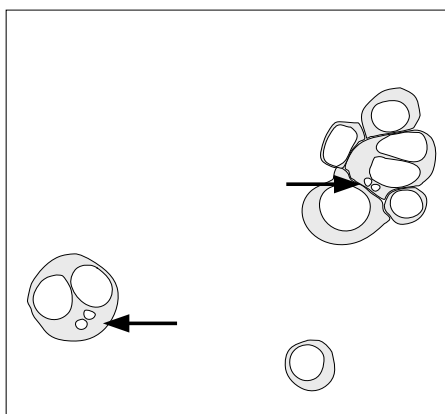
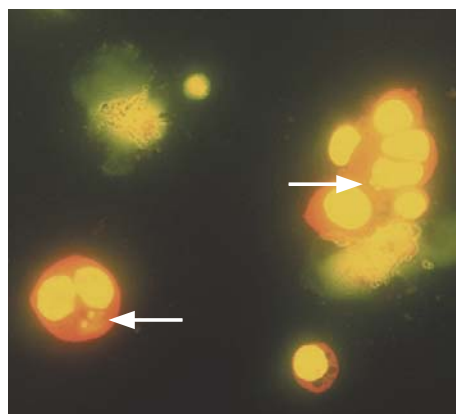
Sørensenpuffer (pH 6,8; autoklaviert)		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	492 ml	1/15 M (5,84 g in 492 ml H <sub>2</sub> O)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	508 ml	1/15 M (4,61 g in 508 ml H <sub>2</sub> O)

Tabelle 2.7

Acridin-Orange-Arbeitslösung		
Acridin-Orange-Stammlösung 1 %	450 µl	1 g Acridin-Orange in 100 ml H <sub>2</sub> O
Sørensenpuffer	71,5 ml	s.o.

Tabellen 2.8

22



lymphozytäre Mikrokerne

nach cytokinesis block method und anschließender Acridin-Orange-Färbung (400fache Vergrößerung) bzw. Schemazeichnung; Foto: M. Müller

Abbildungen 2.1, 2.2

## 2.6 Auswertung der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie mittels FACS Calibur® (Fluorescent Activated Cell Sorting) wurden propidiumjodidmarkierte Zellen mit der Anregungswellenlänge von 488 nm mit einem 15-W-Argon-Laser bestrahlt und die gemessenen Parameter nach Detektion für den entsprechenden Frequenzbereich in 1024 Kanälen verteilt. Bei der Durchflusszytometrie wurden 10.000–12.000 Ereignisse bei niederem Probendruck gemessen. Als Messparameter dienten das Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC; Detektionsfrequenz 488 nm), sowie der Fluoreszenzdetektor für 585 nm (FL2: 585/42 BP). Die Datenaquisition erfolgte unter Verwendung der Software CELL-Quest®. Zur Bestimmung der prozentualen Verteilung der Zellen im Zellzyklus wurde die Analysesoftware ModFit LT® zu Hilfe genommen. Die Einstellung des Analysemodus erfolgte gemäß den Vorgaben für die Messung des DNA-Gehaltes in frischen Geweben (vgl. Handbuch der Software).

23

## 2.7 Chemikalien

Chemikalien			
Acridin-Orange	A 6014	3,6-bis[Dimethylamino]acridin	SIGMA
allgemeine Laborchemikalien			
Cytochalasin B	C 6762	von Helminthosporium dematioideum	SIGMA
DMSO	D 5879	Dimethylsulfoxid	SIGMA
DMEM	D 6046	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	SIGMA
FCS	F 7524	Fetale bovine Serum	SIGMA
L-Glutamin	G 2150	200 mM	SIGMA
Histopaque®	1077		SIGMA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			Fluka Chemica
Na-Pyruvat	S 8636	100 mM Natrium pyruvate solution	SIGMA
nicht-essent. Aminosäuren	M 7145	MEM non-essential amino acid solution	SIGMA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			Serva, Boehringer Ingelheim (FRG)
PBS	D 8537	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	SIGMA
Penicillin/Streptomycin	P 4333	10.000 U Penicillin + 10 mg Streptomycin per ml	SIGMA
Propidiumjodid	P 4170	3,8-Diamino-5-(3-diethylaminopropyl)-6-phenylphenanthridinim iodide	SIGMA
PHA		Phytohämagglutinin (m Form) lyophilisiert	LIFE Technologies, Eggenstein (FRG)
RNAse	R 4875	Ribonuclease Typ I-A	SIGMA
RPMI-1640	R 8758	RPMI-1640 Medium	SIGMA
Trypsin-EDTA	T 3924	0,5 g Trypsin, 0,2 g EDTA	SIGMA

Tabelle 2.8

2.8 Geräte, Computer und Software

24

<b>Geräte</b>		
Autoklav	Melag Typ 28	Melag, Berlin
Cytospin	Cytospin	Shandon GmbH, Frankfurt
Durchflußzytometer	FACS Calibur	Becton-Dickinson, Heidelberg
Filtersystem I3	BP 450 – 490 RKP 519 LP 520	Leica Microsystems
Fluoreszenzmikroskop	Leica DM LB	Leica Microsystems
Fotoautomat	Leica MPS 28	Leica
Fotokamera	Zenza Bronica ETRSi	Zenza Bronica
Fototubus	Selbstanfertigung	
Linearbeschleuniger	SL 7512	Philips
Zentrifuge	Megafuge Heraeus	Heraeus Instruments, Hanau

**Tabelle 2.9**

<b>Computer und Software</b>		
Apple Macintosh	G3/266	Apple
CELLQuest	for Mac	Becton-Dickinson, Heidelberg
Mac OS	Version 8.6	Apple
ModFit LT	Version 2.0 for Mac OS	Varity Software
SPSS	Version 10 for Windows	
Acer Notebook	Travelmate 634X 1.8 GHz	Acer
Windows 2000		Microsoft
Microsoft Office	for Windows	Microsoft
InDesign	Version 2.0 for Windows	Adobe
Illustrator	Version 10.0 for Windows	Adobe
Photoshop	Version 7.0 for Windows	Adobe
Freehand	Version 8.0 for Windows	Macromedia
Schrift	Univers Condensed (TrueType)	Adobe
HP LaserJet	6 MP PostScript	Hewlett Packard

**Tabelle 2.10**

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vorversuche

##### 3.1.1 Vorbemerkungen

Wie in der Literatur beschrieben, kommt es zu einem Ansteigen der MN-Frequenz bei zunehmender Bestrahlungsdosis, beispielsweise Nachtrab et al. (1998) oder Fenech et al. (1985), unter zunehmender Abnahme des Zellüberlebens, z. B. Kaffenberger et al. (1990).

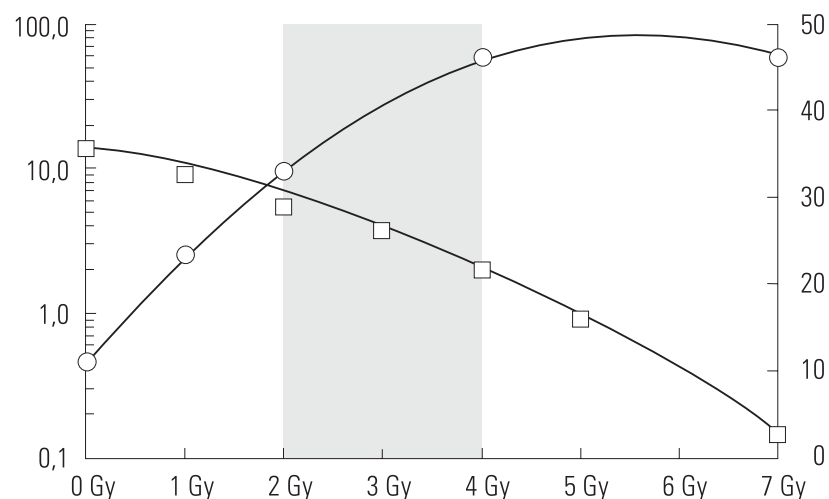
Das Wissen um das umgekehrtproportionale Verhalten von Mikrokernfrequenz und Zellwachstum innerhalb von Geweben findet bei dieser Studie grundlegende Beachtung. Im Rahmen von Vorversuchen ist die Bestimmung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung für jedes Gewebe einzeln betrachtet durchgeführt worden.

25

*Eine jeweilige kurze Beurteilung der Ergebnisse im betreffenden Vorversuch sei bereits in diesem Kapitel aufgrund der besseren Nachvollziehbarkeit und logischen Kontinuität gestattet.*

##### 3.1.2 Experimente mit humanen Fibroblasten

Bei den dieser Arbeit zugrundeliegenden Bedingungen wurde die höchste MN-Frequenz bei Dosen um 4 Gy erreicht. Höhere Bestrahlungsdosen zeigten keine weitere



**Abbildung 3.1**

#### **Dosisfindung für Fibroblastenkulturen**

Darstellung des Zellüberlebens (Colony Assay) mit logarithmischer Skala, Werte als Quadrate und linearer Auftragung der MN-Frequenz (MN-Assay), Werte als Kreise, unter Berücksichtigung der Bestrahlungsdosis; optimaler Dosisbereich ist grau-unterlegt

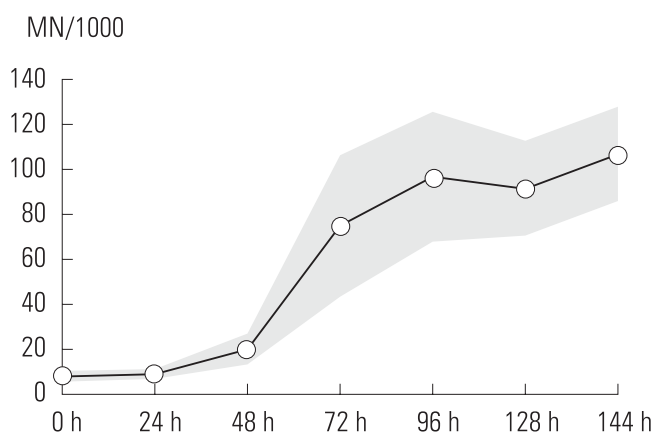
26

Zunahme der MN-Frequenz, sondern führten sogar bei hohen Dosen zu einem Rückgang. Dies kann erklärt werden, dass durch ein verschlechtertes Zellwachstum im hohen Dosisbereich es den Zellen nicht erlaubt ist, eine Zellteilung abzuschließen und MN aus geschädigter DNA auszubilden. Die Kreise in Abb. 3.2 zeigen die durchschnittliche MN-Frequenz (mit Standardabweichung, SD) in Fibroblasten von 10 Patienten mit normaler Strahlenempfindlichkeit, ermittelt für die jeweils angegebenen Dosisbereiche (Kulturzeit von 128 h). Unter Berücksichtigung des ebenfalls bestrahlungsdosisabhängigen Rückgangs der Überlebensrate von Fibroblasten unter Kulturbedingungen, gemessen durch das Zellüberleben (Zellüberleben ermittelt durch den Koloniebildungstest) in laborinterner Untersuchungen, die nicht Bestandteil dieser Arbeit sind (vgl. Quadrate der Abb. 3.1), zeigt sich, dass die Bestimmung der MN-Frequenz an Zellkulturen, deren Zellen einer Bestrahlungsdosis von mehr als 4 Gy ausgesetzt waren, von eingeschränkterem praktischem Wert sind. Werden die Ergebnisse beider Untersuchungen in einem Diagramm zusammengefasst, wird der optimale Dosisbereich der für die weitere Durchführung dieser Arbeit grundlegend ist, deutlich (grauer Bereich in Abb. 3.1).

#### Bestimmung der Kulturdauer nach Bestrahlung mit 4 Gy

Wie in dem Modell für die Auftretenswahrscheinlichkeit von Mikrokerne bezogen auf die Kulturzeit gezeigt wird, steigt die MN-Frequenz exponentiell auf ein Maximum an, um im weiteren Verlauf infolge der rascheren Zunahme von Zellen, die keine MN aufweisen, wieder abzunehmen. Hieraus wird ersichtlich, dass die stärkste Zunahme der MN-Frequenz ab 72 h Kulturzeit erfolgt war. Da bei dieser Arbeit von einem möglichst frühen Zeitpunkt einer maximalen MN-Expression ausgegangen wurde, zeigten sich die Kulturzeiten von 96 h bis 144 h als möglich und die von 96 h als praktisch.

Anhand den aus den Vorversuchen gewonnenen Ergebnisse wird das in Material und Methoden beschriebene Prozedere abgeleitet. Die Fibroblasten werden jeweils nicht (0 Gy), mit 2 Gy oder 4 Gy nach 24 h in Kultur bestrahlt und nach weiteren 72 h geerntet und ausgewertet (vgl. Material und Methoden).



**Bestimmung der Kulturzeit**  
anhand 4 zufällig ausgewählten Patientenzelllinien bei 4 Gy Bestrahlungsdosis; Linie repräsentiert die Mittelwerte, Standardabweichung grau unterlegt

**Abbildung 3.2**

### 3.1.3 Experimente mit humanen Lymphozyten

Bezüglich Kulturdauer bzw. Dosiswirkungsbeziehung, d. h. Abhängigkeit der Anzahl von Mikrokernen pro 1000 Zellen von der Bestrahlungsdosis, findet eine strenge Orientierung an dem von Fenech und Morley (1983) beschriebenen *cytokinesis block micronucleus assay* statt, sodass auf laborintern erhaltene Erfahrungswerte zurückgegriffen werden konnte.

Folglich den Ergebnissen von Wuttke et al. (1993) verhalten sich Zellwachstum und die Anzahl von mikrokerntragenden Zellen bei steigenden Bestrahlungsdosen (0–2,5–5 Gy) gegenläufig (umgekehrt proportional). Als Maß für das Zellwachstum wird hierbei der prozentuale Anteil von binukleären Zellen an der Gesamtzellzahl gewählt. Gemäß diesen Ergebnissen wird das Wachstumsverhalten von T-Lymphozyten im niederen Dosisbereich (0,5–1 Gy) weniger stark beeinflusst als bei höheren Dosen. Eine deutliche Mikrokernfrequenz ist bereits hier zu erheben, auch wenn sie im Vergleich zum hohen Dosisbereich (2,5–5 Gy) niedriger ausfällt.

Nachdem unter den gewählten Kulturbedingungen das Wachstumsverhalten der Lymphozyten unterschiedlich zuverlässig war (z. T. zeigten in Versuchen nur 30 % der in Kultur gewachsenen Zellen akzeptable binukleäre Zellraten) wurde die Entscheidung zugunsten des besseren Wachstums (niedriger Dosisbereich) getroffen und für die Lymphozyten nicht (0 Gy), mit 1 Gy oder 2 Gy bestrahlt.

27

### 3.1.4 Vergleich der Kontrollwerte von verschiedenen Patienten

Die Gruppe der Patienten, die keine Sofortreaktionen im Zuge der Strahlentherapie zeigten, wird als normalsensibles Patientenkollektiv nPat, die Gruppe mit Sofortreaktionen als strahlensensibles Patientenkollektiv sPat bezeichnet

nPat	sPat	p-Wert
Lymph nPat (0 Gy)	Lymph sPat (0 Gy)	0,179
Fibro nPat (0 Gy)	Fibro sPat (0 Gy)	0,055

**Tabelle 3.1**

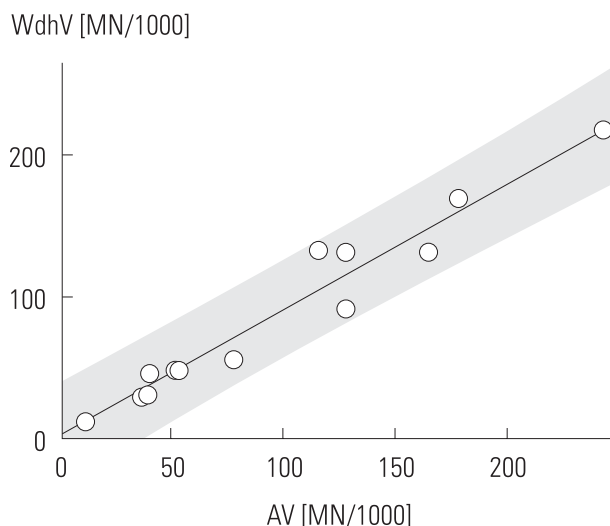
#### basale Schädigungsrate

kein statistisch signifikanter Unterschied der basalen Schädigungsrate im Vergleich der Patientenkollektive nPat und sPat anhand des Mittelwertvergleichtestes bei unabhängigen Stichproben (t-Test)

Die basale Schädigungsrate der Zellen, d. h. die Spontanmikrokernfrequenz (keine Bestrahlung (0 Gy), gleiche Kulturbedingungen) jedes einzelnen Patienten stellt eine wichtige Kontrolle dar, um später die strahleninduzierte Veränderung beurteilen zu können. Außerdem erlaubt es die Aussage, dass die erhaltenen Mikrokernfrequenzen nach Bestrahlung nicht durch den Versuch an sich bedingt oder Folge anderer Störeinflüsse sind.

So ergeben sich für die nPat ein Mittelwert der basalen MN-Frequenz von 8,6 (SD 5,2) gegenüber der sPat von 3,8 (SD 2,71). Unter Betrachtung der Daten im parame-

terfreien Mittelwertsvergleich nach Wilcoxon (bzw. U-Test nach Mann und Whitney) zeigt sich im Gewebe der Fibroblasten bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,001 (0,1 %) kein signifikanter Unterschied. Erweitert man die Voraussetzung der Irrtumswahrscheinlichkeit auf 0,05 (5 %) ist allerdings die Alternativhypothese als angenommen zu betrachten und die Nullhypothese zu verwerfen. Diese schwache Signifikanz ist unter Berücksichtigung der geringen Teststärke des verwendeten Testsystems (relativ großer Fehler 2. Art) als wenig aussagekräftig einzustufen und wird nochmals mittels eines anderen Testsystem weiter betrachtet. Die an den Lymphozyten gewonnen Ergebnisse zeigen bei beiden Irrtumswahrscheinlichkeiten (0,05 und 0,001) unter Anwendung desselben Testsystems keinerlei Signifikanz. Überprüft man dieselben Daten mittels dem etwas statistisch aussagekräftigerem parametrischem Mittelwertvergleichstest bei unabhängigen Stichproben, zeigt sich jeweils ein statistisch nicht signifikanter Levene-Test ( $p_F = 0,467$ ,  $p_L = 0,580$ ), der die Gültigkeit homogener Varianz bestätigt und die Anwendung des t-Test zulässig macht. In diesem statistisch stärkerem Testsystem zeigt sich sowohl für die Fibroblasten ( $p = 0,055$ ) wie auch die Lymphozyten ( $p = 0,179$ ) keine statistische Signifikanz bezüglich ihres Unterschiedes. Zusammenfassend wird die Verteilung der spontanen MN-Frequenz als nicht statistisch signifikant unterschiedlich beurteilt.



**Korrelationsanalyse bei 4 Gy**

der beiden getrennten Versuchsansätze (AV vs. WdhV) bei linearer Regression und 95 % Vorhersageintervall für den Mittelwert

**Abbildung 3.3**

Als weiterer Kontrollfaktor der Zuverlässigkeit der Ergebnisse im Sinne einer Reproduzierbarkeit wurden bei 13 Patienten (jedem zweiten Patienten) getrennte Kontrollversuche bei gleicher Zellpassage der Fibroblasten unter gleichen Bedingungen durchgeführt und gesondert ausgewertet. Die intraindividuelle mittlere Abweichung als Maß des Unterschiedes der zwei Versuchsansätze (Ausgangsversuch AV und Wiederholungsversuch WdhV) beträgt bei 0 Gy 1,51, bei 2 Gy 5,25 und bei 4 Gy 6,98; die interindividuelle mittlere Abweichung vom intraindividuellen Mittelwert liegt bei 0 Gy mit 3,57, bei 2 Gy mit 31,39 und bei 4 Gy mit 55,02 deutlich höher.

AV	WdhV	p-Wert
AV 0 Gy	WdhV 0 Gy	0,0018**
AV 2 Gy	WdhV 2 Gy	< 0,0001**
AV 4 Gy	WdhV 4 Gy	< 0,0001**

**Wertepaare im interindividuellen Vergleich**

anhand bivarianter Korrelationsanalyse;  
\*\* Korrelation auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant

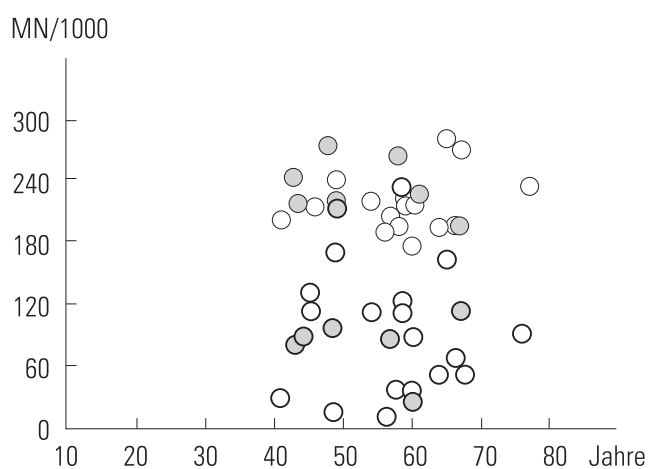
**Tabelle 3.2**

her. Die bereits hierbei zu vermutende Aussage, dass den interindividuellen Unterschieden der MN-Frequenz ursächlich Eigenschaften der Zellen verantwortlich sind und sie nicht Ergebnis einer zufälligen Verteilung von Messwerten ist, lässt sich festigen durch die Korrelationsanalyse bei Vergleich von Ausgangsversuch und Wiederholungsversuch. Gemäß den zugrundeliegenden Daten des in Abb. 3.3 exemplarisch dargestellten Streudiagramms der Fibroblasenkulturen, ergeben sich die Pearsonschen-Maßkorrelationskoeffizienten  $r_{0 \text{ Gy}} = 0,778$  ( $p_{0 \text{ Gy}} = 0,0018$ ),  $r_{2 \text{ Gy}} = 0,924$  ( $p_{2 \text{ Gy}} < 0,0001$ ) und  $r_{4 \text{ Gy}} = 0,972$  ( $p_{4 \text{ Gy}} < 0,0001$ ) für die jeweilige Strahlendosis. Bei angenommener Normalverteilung der Messwerte ist die jeweilige Korrelation von AV zu WdhV statistisch signifikant: Die interindividuellen Unterschiede der Messergebnisse sind demnach Folge unterschiedlicher Eigenschaften (z. B. Strahlensensibilität, Wachstumsverhalten in vitro) der Zellen bzw. der Gewebe des jeweiligen Individuums.

29

### 3.1.5 Einfluss des Alters der Spender auf die Mikrokernfrequenz

Fenech (1993) zeigt in seiner detaillierten Beschreibung der Mikrokerntechnik die Abhängigkeit der Mikrokernfrequenz vom Alter der Probanden, wobei eine deutliche



**Abbildung 3.4**

#### Alter und klinische Sensibilität

feine Linie: MN-Frequenz bei Lymphozyten nach 2 Gy; weiß (○) ohne, grau (●) mit Akutreaktionen; stärkere Linie: MN-Frequenz bei Fibroblasten nach 4 Gy; weiß (○) ohne, grau (●) mit Akutreaktionen

statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen werden konnte ( $p < 0,0001$ ). Seine Aussage fand durch die Festlegung von Altersgrenzen bei den Patientenkollektiven Beachtung. Wie aus Tabelle 6.3 im Anhang zu entnehmen ist, lag das mittlere Alter der Patientinnen, die keine Akutreaktionen zeigten bei 57,4 Jahren, das der Gruppe von Patientinnen mit Akutreaktionen bei 52,9 Jahren, das einer Abweichung des Altersdurchschnittes um ca. 8% bezogen auf das der nPat entspricht.

Die Abb. 3.4 zeigt deutlich, dass sich die MN-Frequenzen der sPat sowohl bei den Lymphozyten, als auch bei den Fibroblas-

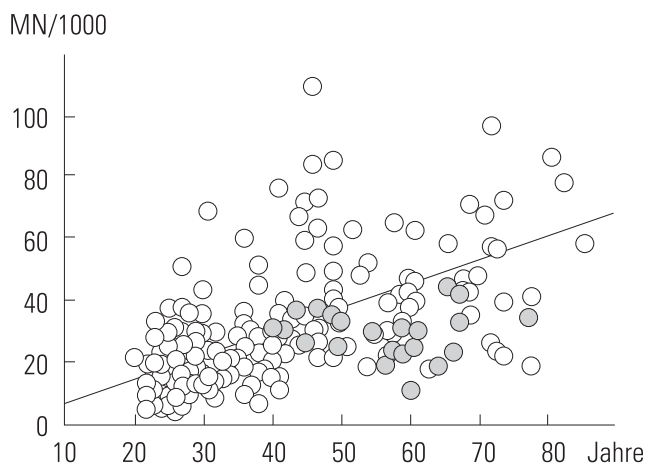
ten im selben Streubereich bewegen, wie die der nPat. Demnach ist deren mögliche Änderung nicht auf den Störeinfluss des Alters zurückzuführen.

Als letzte Qualitätskontrolle der verwendeten Methode wird die spontane lymphozytäre MN-Frequenz aller in dieser Studie untersuchten Patienten mit der von Fenech publizierten verglichen. Es ist, wie Abb. 3.5 verdeutlicht, kein unterschiedliches Fre-



quenzniveau augenfällig, worin die Bestätigung der Zuverlässigkeit des Testsystems und die Güte der Testdurchführung zu sehen ist.

30



**Alter und MN-Frequenz**

weiße Punkte (○): spontane MN-Frequenz (CBMN) von 224 gesunden Australiern nach Fenech (1993) Mutat. Res.

graue Punkte (●): spontane MN-Frequenz der beobachteten Patientinnen ungeachtet ihrer klinischen Empfindlichkeit

**Abbildung 3.5**

3.1.6 Einfluss der Bestrahlung auf die Mikrokernfrequenz

Im direkten Vergleich von Lymphozyten ohne Bestrahlung (0 Gy) und mit Bestrahlung von 2 Gy oder 4 Gy zeigt sich im Mittelwertvergleichstest für zwei abhängige Stichproben jeweils ein statistisch signifikantes Verhalten ( $p < 0,001$ ), ebenso wie im Vergleich der Stichproben von mit 1 Gy und 2 Gy bestrahlten Lymphozyten ( $p < 0,001$ ). Bei den Fibroblastenkulturen findet sich ein ähnlich hochsignifikantes Verhalten, lediglich im Vergleich der mit 2 Gy und 4 Gy bestrahlten Gewebe ist eine etwas geringere (aber immer noch deutliche) Signifikanz vorhanden.

$x_1$	$x_2$	p-Wert
Lymph 0 Gy	Lymph 1 Gy	< 0,001
Lymph 0 Gy	Lymph 2 Gy	< 0,001
Lymph 1 Gy	Lymph 2 Gy	< 0,001
Fibro 0 Gy	Fibro 2 Gy	< 0,001
Fibro 0 Gy	Fibro 4 Gy	< 0,001
Fibro 2 Gy	Fibro 4 Gy	0,009

**Einfluss der Bestrahlung auf MN-Frequenz**

anhand Mittelwertvergleichstest für zwei abhängige Stichproben ( $x_1, x_2$ )

**Tabelle 3.3**

Neben den zahlreichen Publikationen, in denen der Einfluss ionisierender Strahlung auf die Zunahme der MN-Frequenz ausführlich beschrieben wird (vgl. Einleitung), ist die für diese Arbeit grundlegende Annahme bestätigt: eine Zunahme der Bestrahlungsdosis führt in beiden Geweben gleichermaßen zu einer Zunahme der Mikrokernfrequenz.

## 3.2 In-vitro-Ergebnisse

Die Daten der in-vitro-Versuche für das jeweilige Gewebe sind in Tabelle 6.1 bzw. 6.2 (vgl. Anhang) zusammengefasst.

### 3.2.1 Vergleich von Lymphozyten und Fibroblasten

Im direkten Vergleich der Gewebe miteinander zeigt sich kein einheitlich signifikantes Verhalten. So ergibt der Vergleich von nicht bestrahlten Lymphozyten mit nicht-bestrahlten Fibroblasten keine signifikante Korrelation ( $r = 0,291$ ;  $p = 0,168$ ), ebenso

Lymphozyten	Fibroblasten	p-Wert
Lymph 0 Gy	Fibro 0 Gy	0,168
Lymph 1 Gy	Fibro 2 Gy	0,004**
Lymph 2 Gy	Fibro 4 Gy	0,075

**Tabelle 3.4**

#### Vergleich der Testsysteme

anhand bivarianter Korrelationsanalyse;

\*\* Korrelation auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant

wie von mit 2 Gy bestrahlten Lymphozyten und von mit 4 Gy bestrahlten Fibroblasten ( $r = 0,370$ ;  $p = 0,075$ ). Im Gegensatz hierzu zeigt sich im Vergleich der im Mitteldosisbereich bestrahlten Zellen (Lymphozyten mit 1 Gy, Fibroblasten mit 2 Gy) eine auf dem Niveau von 0,01 signifikante Korrelation ( $r = 0,566$ ;  $p = 0,004$ ).

31

### 3.2.2 Vergleich von MN-Frequenz und S-Fraktion bei Fibroblasten

x1	x2	p-Wert
Fibro 0 Gy	S-Fraktion 0 Gy	0,032*
Fibro 2 Gy	S-Fraktion 2 Gy	0,046
Fibro 4 Gy	S-Fraktion 4 Gy	0,229

**Tabelle 3.5**

#### Vergleich MN-Frequenz und S-Fraktion

anhand bivarianter Korrelationsanalyse;

\* Korrelation auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant

Aufgrund einer zu erfolgenden Zellteilung als Voraussetzung für die Entstehung von Mikrokernen wurden die Anzahl der Zellen in der S-Phase (repräsentativ für die sich teilenden Zellen) zum Zeitpunkt der Ernte als Angabe in Prozent der Gesamtzellzahl (entspricht der Fraktion der Zellen in der S-Phase) mit der MN-Frequenz im entsprechenden Gewebe verglichen.

Hierbei ergab sich für die unbestrahlten Zellen (0 Gy) ein auf dem Niveau von 0,05 bei zweiseitiger Betrachtung statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen MN-Frequenz und S-Fraktion ( $p = 0,032$ ), ebenso wie nach Bestrahlung der Zellen mit 2 Gy ( $p = 0,046$ ). Im Gegensatz dazu besteht zwischen MN-Frequenz und S-Fraktion von in-vitro-Zellgeweben nach Bestrahlung mit 4 Gy kein statistisch signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,229$ ). Unter Betrachtung des Pearsonschen-Maßkorrelationskoeffizienten zeigt sich für 0 Gy eine mittlere ( $r = 0,507$ ), für 2 Gy ( $r = 0,477$ ) und 4 Gy ( $r = 0,298$ ) eine geringe Korrelation.

### 3.2.3 Betrachtung des Verhaltens der S-Fraktion im interindividuellen Vergleich in Abhängigkeit von der jeweiligen Bestrahlungsdosis

Die Betrachtung von Mittelwert und Standardabweichung des prozentualen Anteils der Zellen in der S-Phase (S-Fraktion) von den Fibroblasten bei 0, 2 bzw. 4 Gy, ergab ein jeweiliges Wertpaar (Mittelwert mit Standardabweichung) von 6,04 und 4,39 (0 Gy), 3,66 und 3,19 (2 Gy) sowie 2,62 und 2,44 (4 Gy). Unter Betrachtung der Ergebnisse im Mittelwertvergleichstest

S-Fraktion	S-Fraktion	p-Wert
S-Fraktion 0 Gy	S-Fraktion 2 Gy	0,008
S-Fraktion 0 Gy	S-Fraktion 4 Gy	0,001
S-Fraktion 2 Gy	S-Fraktion 4 Gy	0,005

32

für gepaarte Stichproben zeigt der Vergleich der S-Fraktionen für die jeweiligen Strahlendosen, dass die Veränderung der S-Fraktion bei Änderung der Bestrahlungsdosis sich in signifikanter Weise gleich verhält oder anders ausgedrückt, eine signifikante Übereinstimmung des Verhaltens innerhalb der Versuchseinheit infolge der Bestrahlung besteht.

**Vergleich der jeweiligen S-Fraktion unter Berücksichtigung der Bestrahlungsdosis** **Tabelle 3.6**  
 anhand Mittelwertvergleichstest für verbundene Stichproben (gepaarter t-Test)

### 3.2.4 Vergleich der Ergebnisse der Lymphozyten vor und nach Strahlentherapie innerhalb des Normalkollektives (nPat)

Der Vergleich der MN-Frequenz, gemessen an Lymphozyten, die an Patientinnen vor bzw. nach Strahlenbehandlung gewonnen wurden, zeigt bei der Nullkontrolle (0 Gy) wie auch nach Bestrahlung des lymphozytären in-vitro-Gewebes mit 1 Gy Bestrahlungsdosis eine statistisch signifikanter Unterschied ( $p_{0Gy} < 0,001$ ,  $p_{1Gy} = 0,008$ ) unter Betrachtung der Ergebnisse im t-Test für gepaarte Stichproben. Die Ergebnisse des Vergleiches nach Bestrahlung mit 2 Gy Bestrahlungsdosis hingegen waren nicht signifikant unterschiedlich ( $p_{2Gy} = 0,064$ ).

vor Radiatio	nach Radiatio	p-Wert
v_Lymph 0 Gy	n_Lymph 0 Gy	< 0,001
v_Lymph 1 Gy	n_Lymph 1 Gy	0,008
v_Lymph 2 Gy	n_Lymph 2 Gy	0,064

**Wertepaare im interindividuellen Vergleich vor bzw. nach Strahlentherapie** **Tabelle 3.7**  
 anhand des Mittelwertvergleichstestes bei zwei abhängigen Stichproben (t-Test)

### 3.3 Klinische Ergebnisse

Von den insgesamt 23 beobachteten Patientinnen zeigten 7 Akutreaktionen der Haut vom Grad 3 gemäß den RTOG-Kriterien (vgl. Einleitung) im Sinne einer Radiodermatitis acuta. Das Spektrum der klinischen Erscheinungsbilder dieser als strahlensensibel zu betrachtenden Patientinnen reichte vom düsterroten Strahlenerthem, einer ödematösen Hautveränderung bis hin zur großflächig-konfluierenden, feuchten Epidermolyse. Bei symptomorientierter Therapie war ein Abbruch der Strahlenbehandlung in keinem Fall notwendig. Bei den verbleibenden 16 Patientinnen manifestierte sich lediglich ein schwaches Strahlenerthem bei meist trockener Schuppung. Zwei Patientinnen mit Normalgewebsreaktionen zeigten milde Symptome einer Pneumonitis, ohne dass eine steroidale Therapie notwendig geworden wäre. Schwerwiegendere Störungen des Lungengewebes war bei keiner der Patientinnen nachweisbar gewesen.

33

### 3.4 Vergleich der klinischen mit den in-vitro-Ergebnissen

Analog zu dem Vorgehen der Ergebnisse unter 3.1.4 wurden die Daten bestrahlter in-vitro-Gewebe unter der Fragestellung, in welcher Beziehung die MN-Frequenz der in-vitro-Ergebnisse zu den Akutreaktionen der Tumorpatientinnen stehen, betrachtet.

nPat	sPat	p-Wert
Lymph 1 Gy nPat	Lymph 1 Gy sPat	0,02*
Lymph 2 Gy nPat	Lymph 2 Gy sPat	0,225
Fibro 2 Gy nPat	Fibro 2 Gy sPat	0,331
Fibro 4 Gy nPat	Fibro 4 Gy sPat	0,604

**Tabelle 3.8**

**Wertepaare Vergleich klinischer mit den in-vitro Ergebnissen**

anhand des Mittelwertvergleichtestes bei zwei unabhängigen Stichproben (t-Test)

\* Unterschied ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 (2-seitig) statistisch signifikant

So zeigte sich weder bei den mit 2 Gy noch bei den mit 4 Gy bestrahlten Fibroblasten ein signifikanter Unterschied zwischen strahlensensiblen und normalreaktiven Patientinnen bei anzunehmender homogener Varianz (Levene:  $p_{2Gy} = 0,932$ ;  $p_{4Gy} = 0,501$ ) im parametrischen Mittelwertsvergleich bei unabhängigen Stichproben (T-Test:  $p_{2Gy} = 0,331$ ;  $p_{4Gy} = 0,604$ ). Anders verhält es sich bei den Lymphozyten. Bei ebenfalls verworfener

Hypothese der jeweiligen heterogenen Varianz (Levene:  $p_{1Gy} = 0,442$ ;  $p_{2Gy} = 0,869$ ) zeigte sich unter der Bestrahlungsdosis von 1 Gy ein statistisch signifikanter Unterschied (T-Test:  $p_{1Gy} = 0,020$ ) zwischen strahlensensiblen und normalreaktiven Patientinnen – jedoch nicht unter der Bestrahlungsdosis von 2 Gy (T-Test:  $p_{2Gy} = 0,225$ ).

3.5 Zusammenfassung

Anhand der oben genannten Ausführungen lassen sich die Ergebnisse der statistischen Auswertung in nebenstehender Tabelle 3.9 zusammenfassen aus denen folgende Aussagen resultieren:

34

1. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der basalen Schädigungsrate im Vergleich der Patientenkollektive (nPat versus sPat).  
Demnach sind unterschiedliche MN-Frequenzen nicht Folge unterschiedlicher Vorabniveaus der Patientenkollektive.
2. Es zeigt sich ein hochgradig signifikantes Übereinstimmung der Ergebnisse bei Versuchswiederholung (AV versus WdhV). Demnach ist die realisierte Reproduzierbarkeit (Qualitätskriterium von Testsystemen) als gegeben zu betrachten.
3. Es zeigt sich ein hochgradig signifikantes Verhalten bezüglich Zunahme der MN-Frequenz infolge Zunahme der Bestrahlungsdosis bei beiden in vitro Geweben (Lymphozyten und Fibroblasten).
4. Die Zunahme der MN-Frequenz zeigt eine Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis bei den Lymphozyten und den Fibroblasten im niederen, nicht aber im höheren Dosisbereich
5. Es besteht in vitro bei den nichtbestrahlten Fibroblasten ein deutlich übereinstimmendes Verhalten von MN-Frequenz und S-Fraktion, eine weniger zwingende Übereinstimmung im niederen und keine im höheren Dosisbereich existent.

x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	p-Wert
<b>1. basale Schädigungsrate (0 Gy) – nPat vs. sPat</b>		
Lymph nPat	Lymph sPat	0,179
Fibro nPat	Fibro sPat	0,055
<b>2. indiv. Wertepaar im interindiv. Vergleich</b>		
AV 0 Gy	WdhV 0 Gy	0,0018
AV 2 Gy	WdhV 2 Gy	< 0,0001
AV 4 Gy	WdhV 4 Gy	< 0,0001
<b>3. Einfluss der Bestrahlung auf Mikrokernelnfrequenz</b>		
Lymph 0 Gy	Lymph 2 Gy	< 0,001
Lymph 1 Gy	Lymph 2 Gy	< 0,001
Fibro 0 Gy	Fibro 4 Gy	< 0,001
Fibro 2 Gy	Fibro 4 Gy	0,009
<b>4. Vergleich von Lymphozyten und Fibroblasten</b>		
Lymph 0 Gy	Fibro 0 Gy	0,168
Lymph 1 Gy	Fibro 2 Gy	0,004
Lymph 2 Gy	Fibro 4 Gy	0,075
<b>5. MN-Frequenz in Fibroblasten vs. S-Fraktion</b>		
Fibro 0 Gy	S-Fraktion 0 Gy	0,032
Fibro 2 Gy	S-Fraktion 2 Gy	0,046
Fibro 4 Gy	S-Fraktion 4 Gy	0,229
<b>6. Übereinstimmung des Verhaltens der S-Fraktion</b>		
S-Fraktion 0 Gy	S-Fraktion 2 Gy	0,008
S-Fraktion 0 Gy	S-Fraktion 4 Gy	0,001
S-Fraktion 2 Gy	S-Fraktion 4 Gy	0,005
<b>7. Entnahme vor bzw. nach Radiatio</b>		
v_Lymph 0 Gy	n_Lymph 0 Gy	< 0,001
v_Lymph 1 Gy	n_Lymph 1 Gy	0,008
v_Lymph 2 Gy	n_Lymph 2 Gy	0,064
<b>8. MN-Frequenz vs. klinische Reaktion</b>		
Lymph 1 Gy nPat	Lymph 1 Gy sPat	0,02
Lymph 2 Gy nPat	Lymph 2 Gy sPat	0,225
Fibro 2 Gy nPat	Fibro 2 Gy sPat	0,331
Fibro 4 Gy nPat	Fibro 4 Gy sPat	0,604

Tabelle 3.9

6. Es besteht eine deutliche Übereinstimmung des Verhaltens der S-Fraktion innerhalb der Versuchseinheit durch die Bestrahlung.
7. Im Vergleich von Ergebnissen der Lymphozyten, gewonnen vor bzw. nach der notwendigen Strahlenbehandlung, zeigt sich lediglich bei den nicht- und niedrigbestrahlten Zellkulturen ein signifikanter Zusammenhang, nicht aber bei dem Gewebe mit höherer Bestrahlungsdosis.
8. Im Vergleich von in-vitro-Ergebnissen und klinischen Reaktionen ist lediglich bei den niedrig bestrahlten Lymphozyten eine signifikante Übereinstimmung zu erheben. Im höheren Dosisbereich, wie auch bei den Geweben der Fibroblasten, unabhängig der Bestrahlungsdosis, ist eine Übereinstimmung von in-vitro- und klinischen Ergebnissen nicht nachweisbar.

## 4 Diskussion

### 4.1 Vorbemerkungen

Die Heterogenität der Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine auffällige Übereinstimmung mit den veröffentlichten Ergebnissen anderer Forschergruppen. Eine getrennte oder gar isolierte Ergebnis- bzw. Literaturanalyse scheint wenig angebracht. Unter der Zielsetzung, eine innere Stringenz und logische Kontinuität herzustellen bzw. aufrechtzuerhalten, ist die Ergebnisanalyse dieser Arbeit eng mit der Literaturanalyse verbunden.

37

### 4.2 Ergebnisanalyse – Literaturanalyse

Einleitend ist eine Bewertung des MN-Testes anhand Veröffentlichungen in der Literatur unter Berücksichtigung einer vergleichbaren Fragestellung (prädiktives in-vitro-Testsystem für die Strahlenempfindlichkeit von Normalgeweben) vorzunehmen.

Die Zielsetzung der zu zitierenden Studien bestand übereinstimmend darin, die Strahlenempfindlichkeit (mittels MN-Test erhoben) in vitro zu untersuchen und diese Ergebnisse mit dem klinischen Schweregrad von Normalgewebsreaktionen nach Bestrahlung bei Malignompatienten zu vergleichen. Die Sichtung der Ergebnisse innerhalb der Literatur zeigte sich hierbei, wie bereits erwähnt, uneinheitlich. Das Testsystem primär außer acht gelassen, beschreiben mehrere Autoren, z. B. Geara et al. (1993), Burnet et al. (1996), Johansen et al. (1996), Tucker et al. (1999), Kiltie et al. (1999), eine Korrelation zwischen der Strahlenempfindlichkeit von Fibroblasten in vitro und dem Schweregrad von Normalgewebsreaktionen bei Tumorpatienten im Rahmen einer Strahlentherapie. Eine großangelegte Studie von Russel et al. (1998) versagte jedoch bei der gleichen Fragestellung – eine solche Korrelation konnte hierbei nicht gezeigt werden.

Andere Studien von Dunst et Gebhart (1995), Jones et al. (1995), West et al. (1995), Neubauer et al. (1997), Davidson et al. (1999) ergaben eine signifikante Korrelation zwischen der Strahlenempfindlichkeit von Lymphozyten in vitro und von Normalgewebsreaktionen an Malignompatienten. Andererseits fanden Geara et al. (1993) keine derartige Übereinstimmung. In der Mehrheit der Studien wurden sogenannte *clonogenic cell survival assays* verwendet um die Strahlenempfindlichkeit zu messen. Reduziert man die zu betrachtenden Studien auf das Testsystem des Mikrokern-testes, findet man eine Bestätigung des Testsystems betreffend seines Wertes in der Beurteilung signifikanter individueller Variationen der Strahlenempfindlichkeit von Lymphozyten oder Fibroblasten bei Krebspatienten durch mehrere Autoren: Slonina et Gasinska (1998), O'Driscoll et al. (1998), Johansen et al. (1998), Nachtrab et al.

(1998) oder Rached et al. (1998). Jedoch haben, soweit dem Autor bekannt, lediglich wenige veröffentlichte Studien die Korrelation zwischen der Strahlensensibilität von Normalzellen im Sinne von nichtpermanenten Primärkulturen (beurteilt durch den MN-Test) und Normalgewebsreaktionen miteinander verglichen.

Nachtrab et al. (1998) berichten, dass Fibroblasten von strahlensensiblen Patienten, ebenso wie die von homozygoten und heterozygoten Individuen der Ataxia teleangi-ektasia, eine signifikant höhere Mikrokernfrequenz zeigen, als Zellen von nichtsen-siblen Patienten. Auf der Gegenseite fanden Johnson et al. (1998) keine Beziehung zwischen der Strahlenempfindlichkeit von Fibroblasten und der Fibrose als späte Ge-websreaktion auf ionisierende Strahlung bei Patientinnen mit einem Mammakarzi-nom. Auch Slonina et al. (2000) konnten keine signifikante Korrelation zwischen der Strahlenempfindlichkeit normaler Zellen (gezeigt durch den MN-Test) und den aku-ten oder späten klinischen Reaktionen bei Patienten mit Zervix-Karzinom oder Kopf-Hals-Tumoren aufzeigen.

Ein ähnliches Ergebnis erhielten Russel et al. (2000) bei der Untersuchung von 385 Brustkrebspatientinnen. Es konnten zwar echte interindividuelle Schwankungen und Unterschiede betreffend in vitro gewonnen Parametern der fibroblastären Differen-zierung gezeigt werden, doch war die unzulängliche Korrelation mit beobachteter Fibrose nach Strahlenbehandlung augenfällig und das Testsystem des MN-Assays als prädiktives konsequenterweise un-geeignet.

Rached et al. (1998) untersuchten bei ähnlicher Fragestellung (klinische Re-aktionen auf eine Strahlenbehandlung)

Lymphozyten und konnte hierbei keine Beziehung zwischen der MN-Frequenz und dem Auftreten ernster Akutreaktionen bei Malignompatienten finden.

Bei gleicher Fragestellung mittels FISH gelang es Neubauer et al. (1997) nachzuwei-sen, dass auffallende Reaktionen bei einer Strahlenbehandlung im Sinne von Ne-benwirkungen der Therapie mit einer größeren Anzahl von chromosomalen Rearran-gements in Lymphozyten übereinstimmten. Es sind somit durch andere zytogeneti-sche Methoden als dem MN-Test positive Übereinstimmungen gefunden worden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit betrachtet, wird Ähnliches offenkundig: es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen von strahlensen-siblen und normalreaktiven Patientinnen betreffend MN-Frequenz bei den Fibroblas-ten. Hingegen besteht bei den Lymphozyten im Dosisbereich von 1 Gy ein statistisch signifikanter Unterschied, nicht aber bei 2 Gy Bestrahlungsdosis. Eine endgültig zu-friedenstellende Erklärung dieser Beobachtung gelingt dem Autor nicht. Um dieses hier beschriebene Phänomen einer bestrahlungsdosisabhängigen, inhomogenen Korrelation im Gewebe der Lymphozyten von den Ergebnissen von Rached (1998)

**Eur. J. Cancer 34 (1998) 3: 378 – 383**

Rached E. et al.:

»... no predictive value of the micronucleus assay for patients with severe acute reactions of normal tissue after radiotherapy ...«



abzugrenzen, der dieses Phänomen nicht beschreibt, gilt zu bedenken, dass in der zitierten Studie zum einen ein heterogeneres Patientenkollektiv bestanden hat, und zum anderen eine bedeutend höhere Bestrahlungsdosis Verwendung fand (4 Gy). Insbesondere unter Berücksichtigung der Bedeutung der Mechanismen von Apoptose, Nekrose und anderen, noch nicht näher benannten *alternative pathways* (siehe im Text unten), könnte die Bestrahlungsdosis für das Mengenverhältnis der verschiedenen Formen des Zelltodes verantwortlich sein und im niederen Dosisbereich eine bessere Übereinstimmung der *in vitro* Ergebnisse mit den klinischen Reaktionen resultieren. An dieser Stelle ist ergänzend zu erwähnen, dass übereinstimmend auch bei Rached et al. (1998) in ihrer Veröffentlichung, sowohl bei Patienten mit, als auch ohne akuter Reaktionen, nach Strahlentherapie die Höhe mikrokernhaltiger Lymphozyten signifikant höher ( $p < 0,001$ ) war, was dafür sprechen mag, dass zirkulierende Lymphozyten im Zuge der lokal wirkenden Strahlung geschädigt wurden (vgl. Zusammenfassung der Ergebnisse). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich diese signifikante Übereinstimmung lediglich bei niederen Bestrahlungsdosis (1 Gy). Eine endgültig zufriedenstellende Antwort auf dieses Phänomen kann ebenso nicht gegeben werden. Doch erfährt ein direkter Vergleich der Studien durch die unterschiedlichen Rahmenbedingungen (Probandenanzahl, insgesamte Heterogenität der Vergleichskollektive, unterschiedliche Bestrahlungsdosis) eine gewisse Einschränkung und scheint deshalb nur bedingt sinnvoll. Trotzdem könnte auch dieses Phänomen infolge unterschiedlichem, bestrahlungsdosisabhängigem Wachstumsverhalten (wie Zytostase, Apoptose oder Nekrose) der Zellkulturen begründet sein. Auf die Bedeutung dieser Vorgänge wird im Weiteren nochmals ausführlich eingegangen.

39

Betreffend der zweiten Zielsetzung dieser Arbeit fand sich ebenso keine signifikante Übereinstimmung zwischen den MN-Frequenzen im direkten Vergleich der *in-vitro*-Gewebe. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Slo-nina et al. (2000) zu sehen, die die Frage nach einer Korrelation von intraindividuel-ler *in-vitro*-Strahlenempfindlichkeit beim Vergleich der Ergebnisse von Lymphozyten bzw. Fibroblasten betraf. Auch dort war keine signifikante Korrelation augenfällig. Zum selben Schluss kamen Kushi-ro et al. (1990) und Geara et al. (1992), die einen *clonogenic survival assay* für beide Zelltypen benutzten. Im Gegensatz dazu fanden Nunez et al. (1998) eine lineare Korrelation zwischen DNA-Schaden in Lymphozyten und Hautfibroblasten bei ein und demselben Patienten im *PFGE-assay* (Pulsfeldgelelektrophorese).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse im Einklang mit der Literatur stehen und Unterschiede mit anderen Ergebnissen, z. B. Rached et al. (1998), aus nicht deckungsgleichen Rahmenbedingungen resultieren könnten.

Die Tatsache, dass innerhalb der Literatur und bei der vorliegenden Arbeit keine signifikante Korrelation zwischen der in-vitro-Strahlenempfindlichkeit und den Normalgewebsreaktionen bei Patienten im Rahmen einer Strahlenbehandlung innerhalb der Literatur und bei der vorliegenden Arbeit gefunden werden konnten, bestärken nicht die Verwendung des MN-Tests als prädiktives Testsystem. Slonina et al. (2000) stellen in Aussicht, dass möglicherweise neue Einblicke in die Pathogenese der Normalgewebsreaktionen auch neue, nützlichere Testsysteme hervorbringen könnten.

Ein Verwerfen des MN-Assays a priori als unbrauchbar wäre dennoch vorschnell. Mehr scheint es dem Autor notwendig, das Testsystem des MN-Testes zu hinterfragen, und nach Problemfeldern zu suchen, die durch das Testverfahren an sich begründet sein könnten. Deren Kenntnis könnte eine weitergehende Modifikationen des Testsystem ermöglichen und dessen Aussagefähigkeit damit steigern.

40

### 4.3 Testsystemanalyse – Problemanalyse

Allgemein anerkannte und mögliche Probleme des MN-Testes werden in der Literatur, wie bei Slonina (2000), aufgelistet:

- (1) eine interindividuell unterschiedliche Empfindlichkeit auf Cytochalsin B (im Testsystem der Lymphozyten). Diesen Punkt ergänzt Fenech (1997) dadurch, dass die Effizienz, mit der Cyt-B die Zytokinese hemmt, von der verwendeten Konzentration

<b>Cytochalsin B – M. Fenech Mutat. Res. 392 (1997)</b>	
Abkürzung	Cyt-B
Konzentration	1 – 6 µg/ml
Wirkmechanismus	Hemmung der Zytokinese durch Bindung an Komplexe der Plasmamembran mit hohem Molekulargewicht, die die Fähigkeit der Einleitung einer Aktionpolymerisation und damit des mikrofilamentären Aufbaues besitzen

abhängig ist. Konsequenterweise ist demnach dieses Konzentrationsoptimum für jeden Zelltyp an sich zu bestimmen. Die Bedenken einer interindividuellen Empfindlichkeit in Primärkulturen kann er nicht ausräumen. Hingegen widerspricht er dem häufig erhobenen Vorwurf, dass Cyt-B per se MN in binukleären Zellen induzieren könnten. Er verweist auf zahlreiche Studien, dass es hierbei im üblichen Konzentrationsbereich keinen Effekt gibt.

**Tabelle 4.1**

- (2) ein variables Auftreten der spontanen Mikrokernfrequenz
- (3) interindividuelle Unterschiede in der MN-Bildung
- (4) apoptotische und nekrotische Prozesse der in-vitro-Zellkultur

Weitere Faktoren nennt Fenech et al. (1999), Mutat. Res., die die grundlegende MN-Frequenz bei menschlichen Lymphozyten beeinflussen:

- (5) Geschlecht (Frauen um Faktor 1,2 bis 1,6 mal mehr als bei Männern)
- (6) Alter (interindividuelle Unterschiede für jede Altersdekade zwischen 20 Jahren und 80 Jahren)
- (7) Ernährungsfaktoren (wie Folsäure-, Vit-B<sub>12</sub>- oder Homocystin-Plasmaspiegel)

- (8) Beeinflussung durch die Neigung einer einzelnen Zelle zur Apoptose
- (9) genetische Faktoren (nicht hinreichend genau geklärt)
- (10) methodisches Problem: was wird als MN identifiziert

Insbesondere dem Punkt (4) bzw. (8) ist weitere Aufmerksamkeit zu widmen. Hierbei besteht die unausweichliche Notwendigkeit, die Frage nach der biologischen Bedeutung der Mikrokerne anzusprechen.

#### 4.4 Biologische Bedeutung der Mikrokerne

Über die biologische Bedeutung der Mikrokerne ist letztlich keine endgültige Aussage zu machen. Unbestritten ist die Annahme, dass es sich hierbei um Chromatin bzw. Chromosomen oder deren Teile handelt (vgl. Einleitung). Untersuchungen von Abend (1998) werfen die Frage auf, ob Apoptose und Mikrokernbildung als die vorherrschenden Formen des Zelltods in vitro zu gelten haben. Seine Untersuchungen an verschiedenen, bestrahlten Zelllinien ließen morphologisch in vitro neben apoptotischen auch mikrokernhaltige Zellen erkennen. Es imponierten Zellen mit einem hohen Apoptoseanteil (HL-60) und geringem Anteil mikrokernhaltiger Zellen gegenüber Zellen (L929) mit umgekehrtem Verhältnis. Hierbei verweist er auf Ergebnisse, nach denen Untersuchungen an weiteren bestrahlten Zelllinien (insgesamt zehn) bestätigten, dass morphologisch vor allem apoptotische und mikrokernhaltige Zellen in einem zellspezifischen Mengenverhältnis zueinander auftreten. Ein ähnliches Ergebnis findet sich bei Kirsch-Volders et al. (1997) bei R2-100- bzw. K562-Zelllinien. Einer alleinigen Zuweisung der Apoptose als Interphasetod widerspricht Abend an dieser Stelle. Die Einstufung der Mikrokernbildung als Mitosetod hingegen bezeichnet er als deutlich. So scheint die strahleninduzierte Mikrokernbildung in L929-Zellen zumindest teilweise ein aktiver Prozess zu sein, der dem Frühstadium der Apoptose mit Ausbildung großer DNA-Fragmente entspricht. Unter Umständen bedient sich die Zelle zur Mikrokernbildung Teilen des Apoptoseprogramms, ohne es vollständig auszuführen. So konnten Abend et al. (1999) zeigen, dass (1) höhere Chromatinfragmente sich in Mikrokernen ansammeln, wie sie sich auch während der frühen Phase der Apoptose ergeben, (2) die Mikrokernfrequenz durch Substanzen beeinflusst wurde, von denen bekannt ist, dass sie eine wichtige Rolle in der Übermittlung und Ausführung der Apoptose spielen (Endonukleasen, Topoisomerase II, Proteinkinase, Ceramide) und (3) Mikrokerne durch eine reduzierte Transkriptionsfähigkeit charakterisiert sind.

Einige Gene, die die Apoptose regulieren, sind gleichzeitig Teil der Zellzykluskontrolle, spielen aber auch eine zentrale Rolle in der Tumorentstehung (Karzinogenese). Ein Beispiel hierfür ist das Tumorsuppressorgen p53; Dahm-Daphi (2000). Bei einer DNA-

Schädigung wird der Zellzyklus p53-vermittelt entweder am G<sub>1</sub>/S-Kontrollpunkt oder am G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunkt arretiert. Der Wiedereintritt in den Zellzyklus erfolgt erst wieder nach erfolgter Reparatur. Ist das Genom der Zelle irreparabel geschädigt, wird die Apoptose nicht-rezeptorassoziiert induziert. Infolge der DNA-Schädigung steigt die Konzentration des Tumorsuppressorproteins p53 rapide an. Das an sich instabile p53-Protein wird durch die Tyrosinkinase c-Abl aktiviert und weiter stabilisiert. Ob der Zellzyklus angehalten und die geschädigte DNA repariert wird oder ob die Zelle apoptotisch abstirbt, wird von p53 auf noch nicht geklärte Weise bestimmt. Diesen Regulationsmechanismus gibt es, wie Lowe (1993) beschreibt, bei p53-defizienten Zellen nicht, mit der Folge der Entstehung genetisch veränderter Mutanten. Der rezeptorgebundene Aktivierungsweg wird durch verschiedenen Rezeptor-/Ligand-Systeme ausgelöst.

42

Infolge der Rezeptorbindung werden intrazelluläre Rezeptoruntereinheiten sogenannte *death domains* aktiviert und damit eine Kaskade unterschiedlichster Reaktionen ausgelöst, deren gemeinsame Endstrecke in der Apoptose mündet. Betreffend einer Apoptoseinitiierung durch zytotoxische T-Lymphozyten wird beschrieben, dass lymphozytäre CD95-(FasL)-Liganden an den Rezeptor der Zielzelle binden. Das Aggregat aus CD95-Rezeptoren vermittelt über Adaptorproteine FADD und *death effector domains* (DED) die Bindung der Procaspase-8. Es kommt zur Freisetzung der aktiven Caspase-8-Untereinheiten (p11 und p18) vom Rezeptor durch proteolytische Prozesse. Die Untereinheiten spalten nun eine Reihe weiterer Substrate und andere Caspasen-Vorstufen (in vivo für die Vorstufen der Caspasen-3, -6, -7, -8 gezeigt), an deren Ende eine Vielzahl von Caspasen im Zytosol vorhanden sind (Caspasen-Kaskade). Von diesen ist insbesondere die Caspase-3 von Bedeutung, die in der Lage ist, den DNA-Fragmentierungsfaktor (DFF) zu spalten. Durch diese Spaltung kommt es zur Aktivierung von Endonukleasen und durch diese schließlich zur DNA-Fragmentierung; vgl. Raff (1998).

Die oben beschriebenen Aktivierungswege erheben in keinsten Weise den Anspruch auf Vollständigkeit. Ganz im Gegenteil ist bei der Darstellung bewusst auf einzelne

Apoptose	
Morphologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Zellvolumenreduktion</li> <li>– DNA-Kondensation</li> <li>– Kernfragmentierung</li> <li>– weitgehender Erhalt der Membran- und Organellenintegrität</li> <li>– Knospung (»budding«) des Zytoplasmas</li> </ul>
Funktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Aufrechterhaltung der Homöostase ausdifferenzierter Organismen</li> <li>– embryonale Organentwicklung</li> <li>– Hemmung der Onkogenese</li> <li>– Vermeidung der Vermehrung mit viraler DNA infizierter Zellen</li> </ul>
Nachweisverfahren	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Lichtmikroskopie (Morphologie), v.a. Fluoreszenzfarbstoff 4,6-Diamidino-2-Phenylindol</li> <li>– Durchflusszytometrie (sub-G<sub>1/0</sub>-Peak)</li> <li>– TdT-Assay (terminale Desoxynucleotidtransferase)</li> <li>– Annexin-V-Nachweis (Phosphatidylserin)</li> </ul>
Auslösefaktoren	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Hormone, Wachstumsfaktoren</li> <li>– ionisierende Strahlung</li> <li>– Toxine, Chemikalien, Medikamente</li> <li>– Hypoxie</li> <li>– freie Radikale (u.a. Peroxide)</li> <li>– Temperatur</li> <li>– virale Infektion</li> </ul>
Aktivierungswege	<ul style="list-style-type: none"> <li>– rezeptorgebunden (u.a. TNF-Rezeptorfamilie, CD 95/Fas/APO-1, DR3/APO-3, DR4/APO-2, DR5)</li> <li>– rezeptorfrei (u.a. DNA-, Mitochondrien-Schädigung)</li> </ul>

**Tabelle 4.2**

Kontrollmechanismen (Promotor-Suppressor-Systeme) verzichtet worden, um lediglich zwei in der Literatur beschriebene Ablaufmuster vereinfacht darzustellen. Gezielt ist von der Einbindung des Ceramidstoffwechsels (Sphingomyelinprodukte), der Ras-Proteinfamilie oder der Proteinkinase C abgesehen worden. Es ist kaum ein anderer molekularbiologischer Forschungsbereich momentan von solch hohem wissenschaftlichen Wandel durch den Zugewinn neuester Erkenntnisse charakterisiert, wie die Vorgänge um die Apoptose. Sie ist nicht zentrales Thema dieser Arbeit und so scheint dem Autor diese zugegeben einfache Darstellung als ausreichend. Trotzdem sei abschließend auf die von Abend (1998), erwähnte Aussage, dass die meisten Daten der Signaltransduktionswege auf in-vitro-Untersuchungen basieren und deren Gültigkeit in vivo noch zu zeigen ist, hingewiesen.

43

Doch nicht nur Abend et al. (2000) weisen auf die Bedeutung apoptotischer und anderer Prozesse bezüglich des MN-Assay hin. Akudugu et al. (2001) kommen zu ähnlichem Ergebnis: Die fehlende Korrelation zwischen MN-Koeffizienten und der Überlebensfraktion ist vereinbar mit der Ansicht, dass die Mikrokernbildung allein an einem einzigen (frühen) Zeitpunkt nach Bestrahlung gemessen, nicht die Strahlenempfindlichkeit widerspiegelt. Die gleichzeitige Bestimmung des zellulären Schadens mittels Mikrokernbildung und Apoptose-Assay kann die Strahlenempfindlichkeit besser als eines der beiden Testsysteme für sich vorhersagen. Mikrokernhaltige und apoptotische Zellen, die an einem frühen Zeitpunkt nach Bestrahlung gezählt wurden,

spiegeln auch nicht den gesamten Schaden, der endgültig zum Verlust der reproduktiven Integrität führt, wieder. Diese Beobachtungen sind vereinbar mit den Feststellungen von Abend et al. (2000),

**Int. J. Radiat. Biol. 76 (2000) 2: 249 – 259**

Abend M. et al.:

»... correlation of micronucleus and apoptosis assay with reproductive cell death can be improved by considering other modes of death ...«

die die Notwendigkeit eines dritten Parameters (abnormer Zellen) postulierten, um den bedeutungsvollen gesamten strahleninduzierten Zellschaden vorherzusagen. So zeigten sie, dass, wenn man die Bildung von Mikrokernen und Apoptose ebenso wie von abnormalen Zellen (MAA Assay) betrachtet, fügen sich alle zehn Zelllinien zu einer, zelllinienunabhängigen, signifikanten Kurve richtig zusammen. Diese Daten betonen die innewohnende Schwäche von einparametrischen Assays, wenn sie auf

Zelllinien angewendet werden, die durch unterschiedliche Art und Weise des Zelltodes charakterisiert sind.

**Int. J. Radiat. Biol. 75 (1999) 1: 857 – 864**

Guo G.Z. et al.:

»... a significant correlation between clonogenic radiosensitivity and the simultaneous assessment of micronucleus and apoptotic cell frequency ...«

Ebenso kamen Gou et al. (1999) zu der Aussage, dass seine Ergebnisse den

Nutzen der gleichzeitigen Bestimmung von Mikrokernfrequenz und apoptotischer Zellen nahelegen, um die zelluläre, intrinsische Strahlenempfindlichkeit vorherzusagen.

Desweiteren deuten Fenech et al. (1999) in *Mutagenesis* auf den Zusammenhang und die Bedeutung von Nekrose, Apoptose, Zytostase und Mikrokernelbildung hin. In der Originalpublikation nennen sie Aussagen und Zusammenhänge, die in dieser Arbeit bereits an anderer Stelle erwähnt wurden und auf deren erneute Ausführung verzichtet wird. Zusammenfassend schließen sie mit der Schlussfolgerung, dass der CBMN-Assay für die integrierten Messungen von chromosomalen Brüchen und Verlusten, Nekrose, Apoptose und zytostatischen Effekten benutzt werden kann.

Einen anderen Ansatz stellen Kirsch-Volders et al. (2001) zur Diskussion: Eine weiter verfeinerte Bestimmung von DNA-Schaden und genomischen Mutationen kann erhalten werden, wenn man in den CBMN-

44

Assay in die Messung Mikrokerne bei mononukleären Zellen, Mikrokerne bei binukleären Zellen, apoptotische und nekrotische Zellen einschließt.

**Mutat. Res. 495 (2001): 1 – 9**

Fimognari C. et al.:

»... we believe that the combination of assays employed in the present work gives more complete picture of cellular response to possible genotoxic stress ...«

Nahtlos reiht sich hierbei der von Fima-

gnari et al. (2001) hoffnungsvoll gezeichneten Ausblick ein, dass vom forschenden Standpunkt her daran zu glauben ist, dass die Kombination von Testverfahren, wie die in der Originalarbeit verwendeten (MN- und FISH-Assay betreffend genetischem Schaden und durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusprogression und Apoptose), ein vollständigeres Bild zellulären Antwortverhaltens auf mögliche genotoxische Belastungen geben wird.

Ohne der Bedeutung dieser oben genannten Faktoren widersprechen zu wollen, gibt der Autor zu bedenken, dass ein wichtiger Faktor lediglich in der letztgenannten Originalarbeit Aufmerksamkeit findet bzw. von Fenech (2000) erwähnt, sich in anderen Publikationen jedoch nicht integriert findet: das Wachstumsverhalten der Gewebe bzw. deren Beschreibung durch mathematischen Modelle. Letztlich sind alle der genannten Ergebnisse an Zelllinien gewonnen worden, deren Wachstumsverhalten sich von dem, primärer Zellkulturen unterscheidet. Eine deckungsgleiche Übertragung der Methodik auf humane Zellen von Malignompatienten ist damit noch nicht sicher möglich. Abschließend sieht der Autor betreffend des Testsystems der Mikrokerne eben diese zwei Forschungsfelder als zukunftsweisend:

- (1) Die Optimierung des Testsystems durch Klärung der Frage der biologischen Bedeutung der MN bzw. deren Abgrenzung zu apoptotischen Vorgängen und deren Bestimmung
- (2) Gewinnung weitere Informationen betreffend des Wachstumsverhalten in Primärkulturen und hinreichende Charakterisierung durch mathematisch begründete Modellvorstellungen

#### 4.5 Zusammenfassung – Schlussfolgerung

- (1) Alle in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur. Unterschiede mit abweichenden Ergebnissen bei ähnlicher Fragestellung, z. B. Rached et al. (1998), können aus nicht deckungsgleichen Rahmenbedingungen resultieren.
- (2) Die Tatsache, dass innerhalb der Literatur und bei der vorliegenden Arbeit keine signifikante Korrelation zwischen der in-vitro-Strahlenempfindlichkeit und den Normalgewebsreaktionen bei Patienten in Rahmen einer Strahlenbehandlung gefunden werden konnten, bestärken nicht die Verwendung des MN-Tests als prädiktives Testsystem.
- (3) Ein Verwerfen des MN-Assays a priori als unbrauchbar wäre dennoch vor-schnell. Mehr ist es notwendig, das Testsystem des MN-Testes zu hinterfragen und nach Problemfeldern zu suchen, die durch das Testverfahren an sich be-gründet sein können. Deren Kenntnis könnte eine weitergehende Modifikation-ten des Testsystem ermöglichen und dessen Aussagefähigkeit damit steigern.
- (4) Betreffend des Testsystems der Mikrokerne scheinen zwei Forschungsfelder als zukunftsweisend zu sein:
  - (a) Die Optimierung des Testsystems durch Klärung der Frage der biologischen Bedeutung der MN bzw. deren Abgrenzung zu apoptotischen Vorgängen und deren Bestimmung.
  - (b) Gewinnung weitere Informationen betreffend des Wachstumsverhalten in Primärkulturen und hinreichende Charakterisierung durch mathematisch be-gründete Modellvorstellungen.
- (5) Insbesondere Projekte, wie das ins Leben gerufene HUMN *HUman MicroNu-cleus projekt* werden zukünftig an der Gewinnung von Datenmaterial und der daraus resultierenden Optimierung wissenschaftlichen Denkens und Handelns einen wichtigen Beitrag leisten. Dieses *international collaborative project on micronucleus frequency in human populations* wurde organisiert, um Daten aus unterschiedlichen menschlichen Populationen und Zelltypen zusammenzutra-gen, die mittels Mikrokerntest gewonnen wurden; Fenech (1999).

## 5 Literaturverzeichnis

- Abadir R., Hakami N.: Ataxia teleangiectasia with cancer. An indication for reduced radiotherapy and chemotherapy doses;  
Br. J. Radiol., 56 (1983): 343 – 345
- Abend M., van Beuningen D.: Bedeutung apoptotischer Prozesse für die Strahlentherapie – Teil I; Strahlenther. Onkol. 174 (1998) 3: 156 – 166
- Abend M., van Beuningen D.: Bedeutung apoptotischer Prozesse für die Strahlentherapie – Teil II; Strahlenther. Onkol. 176 (1998) 4: 212 – 216
- Abend M., Frombeck S., van Beuningen D.: Indications for an active process underlying spontaneous and radiation-induced micronucleation in L929 cells  
Int. J. Radiat. Biol. 75 (1999) 12: 1567 – 1578
- Abend M., Kehe K., Kehe K., Riedel M., van Beuningen D.: Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death can be improved by considering other modes of death; Int. J. Radiat. Biol. 76 (2000) 2: 249 – 259
- Akudugu J.M., Böhm L.: Micronuclei and apoptosis in glioma and neuroblastoma cell lines and role of other lesions in the reconstruction of cellular radiosensitivity; Radiat. Environ. Biophys. 40 (2001) : 295 – 300
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Jaenicke L.: Molekularbiologie der Zelle; VCH Verlagsgesellschaft mbH; Weinheim, New York, Basel, 3. Auflage (1995): 867ff.
- Bagwell C.B.: Theoretical aspects of flow cytometry data analysis; in Bauer K.D. et al.: Clinical flow cytometry: Principles and application; Williams et Wilkins; Baltimore (1993): 41 – 61
- Baisch H., Otto U., Hatje U., Fack H.: Heterogeneous cell kinetics in tumors analyzed with a simulation model for bromodeoxyuridine single and multiple labeling; Cytometry 21 (1995): 52 – 61
- Bayerl A., Frank D., Lenz A., Höß C., Lukas P., Feldmann H.J., Molls M.: Lokale Tumorkontrolle und kosmetisches Ergebnis nach brusterhaltender Operation und Strahlentherapie bis 56 Gy Gesamtdosis ohne Boost beim Mammakarzinom; Strahlenther. Onkol. (2000) 1: 25 – 32
- Benninghoff A.: Anatomie, makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen; Hrsg. Drenckhahn D. und Zenker W.; Urban und Schwarzenberg, 15. Auflage (1994) Band I: 125, 126
- Blichert-Toft M., Rose C., Anderson J.A., Overgaard M., Axelsson C.K., Andersen K.W., Mouridsen H.T.: Danish randomized trial comparing breast conservation therapy with mastectomy: Six years of life table analysis; J. Nat. Cancer Inst. Monogr. 11 (1992): 19 – 26
- Bloching M., Hofmann A., Berghaus A., Lautenschläger C., Grummt T.: Mikrokerne als Biomarker zum Nachweis der Feldkanzerisierung im oberen Aerodigestivtrakt; HNO 48 (2000) 6: 444 – 450



- Burnet N.G., Wurm R., Peacock J.H.: Low dose-rate fibroblast radiosensitivity in the prediction of patients response to radiotherapy;  
Int. J. Radiat. Biol. 10 (1996): 289 – 300
- Cunliff P.N., Mann J.R., Cameron A.H., Roberts K.D., Ward H.N.: Radiosensitivity in ataxia-teleangiectasia; Brit. J. Radiol. 48 (1975) 5: 374 – 376
- Dahm-Daphi J.: P53: biology and role for cellular radiosensitivity;  
Strahlenther. Onkol. 176 (2000): 278 – 285
- Das H.K.: Synthetic capacities of chromosome fragments correlated with their ability to maintain nucleolar material; J. Cell Biology 15 (1962): 121 – 130
- Davidson S.E., West C.M.L., Elyan S.A.G., Swindells R.: Intrinsic radiosensitivity of normal and tumour cells; Radiother. Oncol. 48 (1998): 13
- Dunst J., Gebhart E.: Unexpected tumor response, radiation myelitis and increase in-vitro-radiosensitivity of lymphocytes in a patient with non-small lung cancer; Radiother. Oncol. 36 (1995): 158
- Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Mammakarzinome; Tumorzentrum München 7. Auflage (1998)
- Fenech M., Morley A.: Measurement of micronuclei in human lymphocytes;  
Mutat. Res. 147 (1985) 1 – 2: 29 – 36
- Fenech M., Morley A.: Cytogenesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effects of in vivo ageing and low dose X-irradiation;  
Mutat. Res. 161 (1986) 6: 193 – 198
- Fenech M.: The cytogenesis-block micronucleus technique: a detailed discription of the method and its application to genotoxicity studies in human populations;  
Mutat. Res. 285 (1993) 1: 35 – 44
- Fenech M.: The advantages and disadvantages of the cytokinesis-blocked micronucleus method; Mutat. Res. 392 (1997) 1 – 2: 11 – 18
- Fenech M., Crott J., Turner J., Brown S.: Necrosis, apoptosis, cytoostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide; Mutagenesis 14 (1999) 6: 605 – 612
- Fenech M., Holland N., Chang W.P., Zeiger E., Bonassi S.: The HUman MicroNucleus Profekt – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans;  
Mutat. Res. 428 (1999) 1 – 2: 271 – 283
- Fenech M.: A mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division;  
Mutagenesis 15 (2000) 4: 329 – 336

- Fimognari C., Nusse M., Cesari R., Cantelli-Forti G., Hrelia P.: Micronuclei induction, cell cycle delay and apoptosis as biomarkers of cellular stress caused by ursodeoxycholic acid in human lymphocytes; *Mutat. Res.* 495 (2001) 1 – 2: 1 – 9
- Findlay P.A., Lippman M.E., Danforth D., McDonald H., dAngelo T., Gorrell C.R., Gerber N.L. Schain W., Lichter A.S.: Mastectomy versus radiotherapy as treatment for stage I – II breast cancer: a prospective randomized trial at the National Cancer Institute; *World J. Surg.* 9 (1985) 5: 671 – 675
- Fisher B., Redmond C., Poisson R., Margolese R., Wolmark N., Wickerham L., Fisher E., Deutsch M., Caplan R., Pilch Y. et al.: Eight year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer; *N. Engl. J. Med.* 320 (1989) 13: 822 – 828
- Fletcher G.H., Levit S.H.: Non-disseminated breast cancer: controversial issues in management; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo n/a (1993)
- Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; Spektrum Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford; 7. Auflage (1996): 801/802
- Freshney R.I.: Culture of animal cells, a manual of basic technique; Alan R. Liss, Inc., New York; 2nd edition (1987): 227 – 256
- Gatti R.A., Boder E., Vinters H.V., Sparkes R.S., Norman A., Lange K.: Ataxia teleangiectasia: an interdisciplinary approach to pathogenesis; *Medicine* 70 (1991) 2: 99 – 117
- Geara F.B., Peters L.J., Ang K.K., Wike J.L., Sivon S.S., Guttenberger R., Callender D.L., Malaise, E.P., Brock W.A.: Intrinsic radiosensitivity of normal human fibroblasts and lymphocytes after high- and low-dose-rate irradiation; *Cancer Research* 52 (1992): 6348 – 6352
- Geara F.B., Peters L.J., Ang K.K., Wike J.L., Brock W.A.: Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal-tissue reactions in radiotherapy patients; *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 27 (1993): 1173 – 1179
- Gilbertz K.-P., Baaske C., van Beuningen D.: Cell kinetic analysis after irradiation in L929- and LLC-MK2-cells by a BrdU/DNA assay; *Strahlenther. Onkol.* 169 (1993) 3: 187 – 195
- Gotoff S.P., Amirmokri E., Liebner E.J.: Ataxia teleangiectasia: neoplasia, untoward response to X-irradiation, and tuberous sclerosis; *Amer. J. Dis. Child.* 114 (1967): 617 – 625.
- Grote S.J., Joshi G.P., Revell S.H., Shaw C.A.: A method for the scrutiny of live mammalian cells in culture and for the measurement of their proliferative ability after X-irradiation; *Int. J. Radiat. Biol.* 39 (1981) 4: 377 – 394
- Grote S.J., Joshi G.P., Revell S.H., Shaw C.A.: Observations of radiation-induced chromosome fragment loss in live mammalian cells in culture and its effect on colony-forming ability; *Int. J. Radiat. Biol.* 39 (1981) 4: 395 – 408

- 50 Guo G. Z., Sasai K., Oya N., Shibata T., Shibuya K., Hiraoka M.: A significant correlation between clonogenic radiosensitivity and the simultaneous assessment of micronucleus and apoptotic cell frequency;  
In. *J. Radiat. Biol.* 75 (1999) 7: 857 – 864
- Hart R.M., Kimler B.F., Evans R.G., Park C.H.: Radiotherapeutic management of medulloblastoma in a pediatric patient with ataxia teleangiectasia;  
*Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 13 (1987) 8: 1237 – 1240
- Heddle J.A.: A rapid in vivo test for chromosomal damage;  
*Mutat. Res.* 18 (1973) 2: 187 – 190
- Howard A., Pelc S.R.: Synthesis of DNA in normal and irradiated cells and its relation to chromosomal breakage; *Heredity* (1953) 6: 261 – 273
- Johansen J., Bentzen S.M., Overgaard J., Overgaard M.: Relationship between the in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, teleangiectasia, and skin erythema after radiotherapy;  
*Radiother. Oncolog.* 40 (1996): 101 – 109
- Johannsen J., Streffer C., Fuhrmann C., Bentzen S.M., Stausbolgron B., Overgaard M., Overgaard J.: Radiosensitivity of normal fibroblasts from breast cancer patients assessed by the micronucleus and colony assays;  
*Int. J. Radiat. Biol.* 73 (1998) 6: 671 – 678
- Jones L.A., Scott D., Cowan R., Roberts S.A.: Abnormal radiosensitivity of lymphocytes from breast cancer patients with excessive normal-tissue damage after radiotherapy: chromosome aberrations after low-dose-rate irradiation;  
*Int. J. Radiat. Biol.* 67 (1995): 519 – 528
- Kaffenberger W., Becker K., van Beuningen D.: Comparison of micronucleus frequencies and proliferation kinetics in three X-irradiated cell lines;  
*Strahlenther. Onkol.* 166 (1990) 9: 617 – 625
- Kato H., Sandberg A.A.: Chromosome pulverization in human cells with micronuclei;  
*J. Nat. Cancer Inst.* 40 (1968): 165 – 179
- Kiltie A.E., Ryan A.J., Swindell R., Barber J.B.P., West C.M.L., Magge B., Hendry J.H.: A correlation between residual radiation-induced DNA double-strand breaks in cultured fibroblasts and the late radiotherapy reactions in breast cancer patients; *Radiother. Oncolog.* 51 (1999): 55 – 65
- Kirsch-Volders M., Elhajouji A., Cundari E., van Hummelen P.: The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction;  
*Mutat. Res.* 392 (1997) 1 – 2: 19 – 30
- Kirsch-Volders M., Fenech M.: Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes;  
*Mutagenesis* 16 (2001) 1: 51 – 58

- Kramer J., Schaich-Walch G., Nusse M.: DNA synthesis in radiation-induced micronuclei studied by BrdUrd labelling and anti-BrdUrd antibodies; *Mutagenesis* (1990) 5: 491 – 495
- Kushiro J.I., Nakamura N., Kyoizumi S., Nishiki M., Dohi K., Akiyama M.: Absence of correlation between radiosensitivity of human T-lymphocytes in G<sub>0</sub> and skin fibroblasts in log phase; *Radiat. Res.* 122 (1990): 326 – 332
- Lowe S.W., Schmitt E.M., Smith S.W., Osborne B.A., Jacks T.: p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes; *Nature* 362 (1993): 847 – 849
- Marnett L.J.: Oxiradical and DNA damage; *Carcinogenesis*; 21 (2000) 3: 361 – 370
- Morgan J.L. et al.: Radiation reaction in ataxia teleangiectasia; *Amer. J. Dis. Child.* 116 (1968) 5: 557 – 558
- Nachtrab U., Oppitz U., Flentje M., Stopper H.: Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy; *Int. J. Radiat. Biol.* 73 (1998) 3: 279 – 287
- Neubauer S. et al.: The impact of complex chromosomal rearrangements on the detection of radiosensitivity in cancer patients; *Radiother. Oncolog.* 43 (1997): 189 – 195
- Nunez M.I., Guerrero M.R., Lopez E., del Moral M.R., Valenzuela M.T., Siles E., Villalobos M., Pedraza V., Peacock J.H., Ruiz de Almodovar J.M.: DNA damage and prediction of radiation response in lymphocytes and epidermal skin human cells; *Int. J. Cancer* 76 (1998): 354 – 361
- O'Driscoll M.C., Scott M.C., Orton C.J., Kiltie A.E., Davidson S.E., Hunter R.D., West C.M.L.: Radiation-induced micronuclei in human fibroblasts in relation to clonogenic radiosensitivity; *Brit. J. Cancer* 78 (1998): 1559 – 1563
- Perez C.A., Brady L.W.: *Principles and Practice of Radiation Oncology*; Lippincott, Raven, 3. Auflage (1997): 50ff.
- Pfleiderer A., Breckwoldt M., Martius G.: *Gynäkologie und Geburtshilfe*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York; 4. Auflage (2001): 224ff.
- Pschyrembel: *Klinisches Wörterbuch*; Walter de Gruyter, Berlin, New York, 257. Auflage (1994)
- Rached E., Schindler R., Beer K.T., Vetterli D., Greiner R.H.: No predictive value of the micronucleus assay for patients with severe acute reaction of normal tissue after radiotherapy; *Eur. J. Cancer* 34 (1998) 3: 378 – 383
- Russell N.S., Grummels A., Hart A.A.M., Smolders I.J.H., Borger J., Bartelink H., Begg A.C.: Low predictive value of intrinsic fibroblast radiosensitivity for fibrosis development following radiotherapy for breast cancer; *Int. J. Radiat. Biol.* 73 (1998): 661 – 670

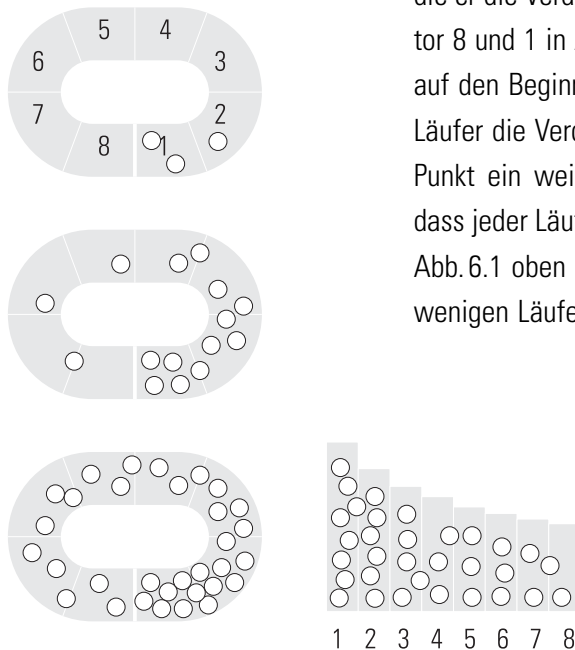
- Russell N.S., Lara P.C., Grummels A., Hart A.A.M., Coco-Martin J.M., Bartelink H., Begg A.C.: In vitro differentiation characteristics of human skin fibroblasts: correlation with radiotherapy-induced breast fibrosis in patients;  
Int. J. Radiat. Biol. 76 (2000) 2: 231 – 240
- Sarrazin D., Le M.G., Arriagada R., Contesso G., Fontaine F., Spielmann M., Rochard F., Le Chevalier T., Lacour J.: Ten-year results of a randomized trial comparing a conservative treatment to mastectomy in early breast cancer;  
Radiother. Oncol. 14 (1989) 3: 177 – 184
- Sauer R., Dunst J.: Risikoadaptierte Strahlenbehandlung des Mammakarzinoms; Spezielle gynäkologische Onkologie II (Hrsg.: Schmidt-Matthiesen H.), Urban & Schwarzenberg, München, 2. Aufl. (1989): 254
- Scherer E., Sack H.: Strahlentherapie; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 3. Auflage (1996): 118, 665, 677, 678
- Schiff C., Zieres C., Zankl H.: Exhaustive physical exercise increases frequency of micronuclei; Mutat. Res. 389 (1997) 2 – 3: 243 – 246
- Schiffmann D., De Boni U.: Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylsilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise;  
Mutat. Res. 246 (1991) 1: 113 – 122
- Schmid W.: The micronucleus test for cytogenic analysis. In: Hollaender, A. (ed.): Chemical Mutagens.; 4. Plenum Press, New York – London (1976): 31 – 53
- Schmid W.: The micronucleus test; Mutat. Res. 31 (1975) 1: 9 – 15
- Schmuck G., Lieb G., Wild D., Schiffmann D., Henschler D.: Charakterization of an in vitro micronucleus assay with Syrian hamster embryo fibroblasts;  
Mutat. Res. 203 (1988) 6: 397 – 404
- Shackney S.E., Shankey T.V.: Cell cycle models for molecular biology and molecular oncology: exploring new dimensions; Cytometry 35 (1999): 97 – 116
- Slonina D., Gasinska A.: Intrinsic radiosensitivity of healthy donors and cancer patients as determined by the lymphocytes micronucleus assay;  
Int. J. Radiat. Biol. 72 (1997): 693 – 701
- Slonina D., Klimek M., Szpytma T., Gasinska A.: Comparison of the radiosensitivity of normal-tissue cells with normal-tissue reactions after radiotherapy;  
Int. J. Radiat. Biol. 76 (2000) 9: 1255 – 1264
- Smith J., Martin L.: Do cells cycle?;  
Proc. Natl. Acad. Sci USA 70 (1973): 1263 – 1267
- Stopper H., Mueller S.O.: Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview; Toxicology in vitro 11 (1997): 661 – 667
- Streffer C., van Beuningen D., Gross E., Schabronath J., Eigler F.W., Rebmann A.: Predictive assays for the therapy of rectum carcinoma;  
Radiother. Oncol. 5 (1986) 4: 303 – 310

- Streffer C.: Genetische Prädisposition und Strahlenempfindlichkeit bei normalen Geweben; *Strahlenther. Onkol.* 173 (1997) 9: 462 – 468
- Surrallés J., Xamena N., Creus A., Marcos R.: The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair; *Mutat Res.* 342 (1995): 43 – 59
- Raff M.: Cell suicide for beginners; *Nature* 396 (1998): 119 – 122
- Romestaing P., Lehingue Y., Carrie C., Coquard R., Montbarbon X., Ardiet J.M., Mammelle N., Gerard J.P.: Role of a 10-gy boost in the conservative treatment of early breast cancer: results of a randomized clinical trial in Lyon, France; *J. Clin. Oncol.* 15 (1997) 3: 963 – 968
- Thacker J.: Cellular radiosensitivity in ataxia teleangiectasia; *Int. J. Radiat. Biol.* 66 (1994) 6: 87 – 96
- Tucker J.D., Preston R.J.: Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assesment; *Mutat. Res.* 365 (1996) 1 – 3: 147 – 159
- Tucker S.L., Geara F.B., Peters L.J., Brock W.A.: How much could the radiotherapy dose be altered for individual patients based on a predictive assay of normal-tissue radiosensitivity? *Radiother. Oncol.* 38 (1996): 103 – 113
- West C.M., Elyan S.A.G., Berry P., Cowman R., Scott D.: A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia-teleangiectasia (AT) and AT heterozygotes; *Int. J. Radiat. Biol.* 68 (1995): 197 – 203
- Wuttke K., Streffer C., Müller W.-U.: Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes; *Mutat. Res.* 286 (1993): 181 – 188
- Veronesi U.: Brusterhaltende Chirurgie des Mammakarzinoms; *Fortschr. Med.* 107 (1989): 748 – 752

## 6 Anhang

### 6.1 Anschauungsmodell nach Bagwell C. B. (1993)

Um sich das quantitative Verteilungsmuster der Wachstumsfraktion in einem nicht synchronisierten Zellzyklus leichter vorstellen zu können beschreibt Bagwell den Zellzyklus bildhaft anhand einer Rennbahn, über deren Ende quer eine Linie verläuft,



**Abbildung 6.1**

#### **Verteilung nach Lebensalter der Zelle im Zellzyklus**

Achtung: die Punkte repräsentieren symbolisch die Läufer, deren jeweilige Anzahl stellt aber nicht die reelle quantitative Verteilung dar!

Die Läuferdichte nimmt über die Strecke der Bahn demnach ab. Diese Abnahme (gegen die Laufrichtung der Läufer betrachtet) verhält sich nicht linear sondern folgt einer abnehmenden Exponentialfunktion, die bei  $2 \times$  (doppelte Anzahl – kurz nach der Linie, Sektor 1) beginnt und bei  $1 \times$  (einfache Anzahl – kurz vor der Linie, Sektor 8) endet. Als Diagramm lässt sich diese Funktion darstellen, indem man die Rennbahn an der Verdopplungslinie auftrennt und gestreckt abrollt (vgl. Abb. 6.1 unten rechts). Die Höhe der Sektorenbanden stellt die Anzahl der Läufer innerhalb des Sektors dar. Überträgt man dieses Modell auf den Zellzyklus (= Rennbahn), so kommt man zu der Aussage, dass die Verteilung der Zellen (= Läufer) gemäß ihres relativen Zellalters (= zurückgelegte Distanz auf der Rennbahn) einer zu beschreibenden, abnehmenden Exponentialfunktion folgt.

## 6.2 Mathematische Herleitung der Wachstumsfunktion

Eine übersichtliche Herleitung der Wachstumsgleichung findet sich bei H. E. Müller, Pädagogische Hochschule Schwäbisch Gmünd (Vorlesung):

Die Zeitspanne zwischen zwei Zellteilungen nennt man die Verdopplungs- oder Generationszeit  $t_d$  (unter der Annahme, dass sich alle Zellen teilen). Teilt sich eine Zelle in der Kultur, dann wächst die Gesamtzahl um 1, es werden aber zwei »junge« Zellen in die Kultur hinein »geboren«. Man muss daher zwischen der Wachstumsrate  $W$  und der Geburtsrate  $G$  unterscheiden.

56

1. Die Wachstumsrate  $W$  gibt an, wieviele Zellen pro Zeiteinheit hinzukommen:

$$W = \left( \frac{dN}{dt} \right)_t$$

2. Die Geburtsrate  $G$  gibt die Anzahl der neu hinzukommender junger Zellen an und ist doppelt so groß, wie die Wachstumsrate:

$$G = 2 \cdot W$$

Jede Zelle hat ein individuelles Zellalter  $\tau$ , welches nach der Mitose beginnt ( $\tau = 0$ ) und vor der erneuten Teilung seinen Maximalwert erreicht, welcher der Verdopplungszeit ( $\tau = t_d$ ) entspricht. Mit diesen wenigen Angaben kann bereits eine Vorhersage über das Wachstumsverhalten gemacht werden: aus einer Zelle werden zwei, die teilen sich zu vier usw. Demnach handelt es sich bei der Wachstumsfunktion um ein exponentielles Wachstum.

3. Es gilt die Annahme einer Population gleicher Zellen in einem unendlich großem Milieu.

4. Die Zunahme der Individuen  $dN$  pro Zeitintervall  $dt$  hängt ab von der Zellzahl  $N$  zu einem Zeitpunkt  $t$  und der im Proportionalitätsfaktor  $\mu$  enthaltenen Verdopplungszeit  $t_d$ :

$$dN = \mu \cdot N \cdot dt$$

$$\frac{dN}{N} = \mu \cdot dt$$

oder

5. Durch Integration der Gleichung erhält man unter den Randbedingungen:  $t=0 \rightarrow N=N_0$

$$\int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = \int_0^t \mu \cdot dt$$



bzw.

$$[\ln N]_{N_0}^N = [\mu \cdot t + konst]_0^t$$

6. Nach Auflösen des Ausdrucks erhält man:

$$\ln N - \ln N_0 = \mu \cdot t$$

oder

$$\ln \left( \frac{N}{N_0} \right) = \mu \cdot t$$

oder

$$\frac{N}{N_0} = e^{\mu \cdot t}$$

oder

$$N = N_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

7. Die Bedingungen für die Generationszeit (Verdopplung der Menge  $N_0$  innerhalb  $t_d$ ) eingesetzt ( $t = t_d \rightarrow N = 2N_0$ ) ergibt:

$$2 \cdot N_0 = N_0 \cdot e^{\mu \cdot t_d}$$

$$\ln 2 = \mu \cdot t_d$$

8. Damit ergibt sich für den Proportionalitätsfaktor  $\mu$ :

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d}$$

**Formel 6.1**

9. Daraus ergibt sich die Wachstumsfunktion

$$N = N_0 \cdot e^{\left(\frac{t}{t_d}\right) \cdot \ln 2}$$

6.3 Zahlentafeln der Ergebnisse der Fibroblasten

58

Nr.	Gy	Ausgangsversuch			Wiederholungsversuch			S-Fraktion
		MN/1000	2 MN	> 2 MN	MN/1000	2 MN	> 2 MN	
92	0	25,3	1	1	22,9	1	1	16,75
	2	100,5	11	5	11,5	14	2	14,58
	4	164,7	19	12	128,2	16	6	11,20
93	0	7,6	0	0	10,0	0	0	5,46
	2	45,9	11	0	46,4	11	0	2,32
	4	52,2	8	5	48,0	8	7	1,82
96	0	10,1	0	0	9,8	0	0	6,72
	2	41,5	4	3	63,7	4	0	1,43
	4	77,5	8	10	56,3	9	0	0,75
100	0	3,9	0	0	2,7	0	0	1,91
	2	38,2	5	0	40,7	8	2	0,97
	4	38,8	7	7	47,0	5	4	0,76
104	0	7,9	0	0	4,6	0	0	6,62
	2	8,7	0	0	11,0	1	0	1,58
	4	10,7	1	0	12,3	1	1	1,26
107	0	16,9	0	0	10,4	1	0	3,17
	2	112,2	16	3	91,4	13	3	3,40
	4	177,4	19	10	168,2	39	28	1,50
108	0	6,7	1	0	15,4	2	0	9,68
	2	24,9	0	1	26,5	3	1	5,66
	4	37,2	4	4	31,5	1	3	1,54
112	0	7,6	0	0	7,6	0	0	3,34
	2	36,6	8	1	45,0	9	1	1,35
	4	50,4	4	5	47,9	10	4	1,28
113	0	3,5	0	0				1,59
	2	9,8	0	0				0,89
	4	8,4	0	0				1,30
114	0	11,4	0	0	8,6	0	0	3,55
	2	101,4	14	7	100,7	10	6	5,06
	4	128,2	20	16	91,8	14	16	3,51
115	0	9,3	0	0	3,8	0	0	11,96
	2	78,7	8	6	84,6	10	5	3,89
	4	114,5	21	11	132,4	16	10	2,33
116	0	4,9	0	0				1,62
	2	72,6	12	5				1,93
	4	91,0	13	6				1,16
117	0	7,0	0	1	4,2	0	0	9,15
	2	122,9	23	4	94,7	19	4	3,86
	4	242,4	66	15	215,8	44	12	2,25
118	0	6,8	1	0				3,42
	2	92,4	10	1				2,32
	4	115,5	19	12				4,23
129	0	2,9	0	0				4,78
	2	59,2	6	3				2,05
	4	113,4	19	7				1,10
135	0	11,1			9,6			
	2	81,2			105,0			
	4	126,5			131,6			

Nr.	Gy	Ausgangsversuch			Wiederholungsversuch			S-Fraktion
		MN/1000	2 MN	> 2 MN	MN/1000	2 MN	> 2 MN	
138	0	4,8	0	0	3,0	0	0	13,07
	2	30,1	1	0	38,8	4	0	3,72
	4	36,1	2	7	29,8	3	3	3,19
140	0	7,7	0	0				3,14
	2	75,5	13	1				6,74
	4	91,3	20	5				4,34
141	0	6,0	1	0				2,83
	2	40,1	4	0				4,21
	4	20,6	0	2				3,62
144	0	2,0	0	0				
	2	115,5	10	5				
	4	80,6	7	1				
HS 6	0	2,0	0	0				
	2	90,5	10	3				
	4	99,5	14	11				
HS 8	0	6,9	0	0				
	2	127,5	10	6				
	4	214,1	21	12				
HS 13	0	1,0	0	0				
	2	43,7	0	0				
	4	92,9	8	3				
HS 14	0	7,9	0	0				
	2	54,8	4	1				
	4	116,3	20	10				
HS 15	0	1,0	0	0				
	2	68,7	6	1				
	4	87,4	12	9				

Tabelle 6.1

**In-vitro-Ergebnisse im Gewebe der Fibroblasten**

gemäß dem in Material und Methoden durchgeführtem Proceder durch Auswertung im Fluoreszenzmikroskop nach Acridin-Orange-Färbung bzw. nach Durchflusszytometrie mittels Propidiumjodid

## 6.4 Zahlentafeln der Ergebnisse der Lymphozyten

Nr.	Gy	vor Radiatio			nach Radiatio		
		MN/1000	2 MN	> 2 MN	MN/1000	2 MN	> 2 MN
92	0	44,8	0	1	58,6	1	0
	1	106,5	3	0	144,5	7	1
	2	278,9	15	6	309,7	36	7
93	0	33,8	1	0	60,7	3	0
	1	105,7	3	1	120,3	5	1
	2	267,2	12	5	270,6	39	8
96	0	23,8	3	0	48,1	0	0
	1	98,0	3	0	156,4	6	0
	2	196,4	23	5	309,3	15	1
100	0	24,7	2	1	59,2	4	1
	1	75,1	3	0	133,3	0	0
	2	205,7	20	3	266,7	10	0
104	0	25,4	2	0	37,9	2	1
	1	92,3	5	0	101,5	7	0
	2	239,0	26	3	274,5	25	3
107	0	33,7	4	0			
	1	99,7	9	2			
	2	239,1	30	7			
108	0	25,9	2	0			
	1	76,0	4	1			
	2	174,6	14	3			
112	0	19,9	2	0	34,8	2	0
	1	78,5	4	2	104,1	10	2
	2	192,6	14	2	250,5	26	4
113	0	20,5	2	0	37,7	0	0
	1	71,9	3	1	96,5	4	0
	2	189,5	13	0	196,3	20	4
114	0				41,0	6	1
	1				87,4	4	2
	2				185,0	22	0
115	0	23,8	0	0			
	1	83,0	6	1			
	2	194,4	16	4			
116	0	34,9	2	1			
	1	109,0	0	1			
	2	233,5	16	2			
117	0	31,4	0	0			
	1	104,5	3	4			
	2	220,2	8	2			
118	0	31,0	0	0			
	1	87,9	4	3			
	2	215,1	15	9			
129	0	37,9	0	0			
	1	86,7	4	3			
	2	213,8	15	9			
138	0	30,6	2	0			
	1	100,9	5	2			
	2	202,0	18	3			

Nr.	Gy	Ausgangsversuch			Wiederholungsversuch		
		MN/1000	2 MN	> 2 MN	MN/1000	2 MN	> 2 MN
140	0	11,9	0	0			
	1	73,8	3	0			
	2	215,4	12	2			
141	0	30,9	0	2			
	1	88,2	7	2			
	2	224,9	8	8			
144	0	23,7	2	1			
	1	84,8	9	3			
	2	241,3	23	7			
HS 6	0	25,8	0	0			
	1	70,4	1	0			
	2	218,8	4	1			
HS 8	0	35,6	0	0			
	1	117,1	2	1			
	2	271,4	24	6			
HS 13	0	27,3	0	0			
	1	102,3	2	0			
	2	216,4	9	3			
HS 14	0	42,9	3	4			
	1	92,4	6	4			
	2	195,0	13	5			
HS 15	0	31,6	0	1			
	1	105,0	6	2			
	2	261,4	23	12			

Tabelle 6.2

**In-vitro-Ergebnisse im Gewebe der Lymphozyten**

gemäß dem in Material und Methoden durchgeführtem Proceder durch Auswertung im Fluoreszenzmikroskop nach Acridin-Orange-Färbung

## 6.5 Patientendaten

Nr.	Alter	Stress	T	N	M	Dosis	RTOG early
92	65 J.		T2	N1 (3/14)	Mx	50 Gy <sup>10 MeV</sup> + 10 Gy <sup>Boost</sup>	1 (Haut)
93	67 J.	Nikotin	T2	N0 (0/13)	Mx	50 Gy <sup>10 MeV</sup> + 10 Gy <sup>Boost</sup>	1 (Haut)
96	66 J.		T1c	N0	Mx		1 (Haut + Lunge)
100	57 J.		T1c	N1 (1/8)	Mx		1 (Haut)
104	49 J.	Nikotin	T1c	N0 (0/5)	Mx	50 Gy <sup>5/10 MeV</sup> + 10 Gy <sup>Boost</sup>	1 – 2 (Haut)
107	60 J.		T1c	N0	Mx	50 Gy <sup>5 MeV</sup> + 16 Gy <sup>10 MeV</sup>	2 (Haut)
108	64 J.		T2	N0 (0/12)	Mx	50 Gy <sup>10 MeV</sup> + 4 × 2,5 Gy <sup>Boost</sup>	1 (Haut)
112	56 J.		T1c	N0 (0/12)	Mx		1 (Haut)
113	54 J.	Nikotin	T1b	N0 (0/16)	Mx		1 – 2 (Haut)
114	58 J.	Nikotin	T1c	N0	Mx	50 Gy <sup>10 MeV</sup> + 4 × 2,5 Gy <sup>12 MeV</sup>	1 (Haut)
115	77 J.		T1c	N0 (0/15)	Mx	50 Gy <sup>10 MeV</sup> + 16 Gy <sup>Boost</sup>	1 (Haut)
116	59 J.		T2	N0 (0/14)	Mx	50 Gy <sup>10 MeV</sup> + 5 × 2 Gy <sup>12 MeV</sup>	2 (Haut)
117	59 J.		T1c	N0 (0/10)	Mx		1 (Haut)
118	67 J.		T2	N1	Mx	50 Gy <sup>10 MeV</sup> + 10 Gy <sup>Boost</sup>	1 (Haut)
129	46 J.	Nikotin	T2	N0 (0/19)	Mx		1 (Haut)
135	41 J.		T1a	N0 (0/5)	Mx		0 – 1 (Haut)
138	60 J.	3 × CMF	T2	N0 (0/12)	Mx		0 – 1 (Haut)
140	61 J.		T1a	N0 (0/18)	Mx		0 – 1 (Haut)
141	65 J.		T2	N0	Mx	50 Gy <sup>10 MeV</sup> + 6 Gy <sup>Boost</sup>	2 (Haut)
144	43 J.		T1c	N1 (2/8)	Mx		3 (Haut)
HS6	49 J.						3 (Haut)
HS8	48 J.		T1	N0 (0/9)	M1	50 Gy <sup>10 MeV</sup> + 2 × 2 Gy <sup>14 MeV</sup>	3 (Haut)*
HS13	44 J.		T2	N1	Mx	50 Gy <sup>10 MeV</sup> + 10 Gy <sup>12 MeV</sup>	3 (Haut)
HS14	67 J.		T1b	N0 (0/23)	Mx	50 Gy <sup>10 MeV</sup> + 10 Gy <sup>Boost</sup>	3 (Haut)
HS15	58 J.					50 Gy <sup>5 MeV</sup> + 10 Gy <sup>10 MeV</sup>	3 (Haut)

62

**Daten der Patientinnen**

aufgelistet nach Verschlüsselungsnummer, Alter, Tumorstadium, Gesamtbestrahlungsdosis und Frühreaktionen gemäß der RTOG-Stadieneinteilung (vgl. Einleitung)

**Tabelle 6.3**

## Danksagung

Mein Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Strahlentherapie an der Universitätsklinik Würzburg und dem Institut für Toxikologie der Universität Würzburg, die durch ihre aktive Mithilfe und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Namentlich möchte ich mich bei folgenden Personen (in alphabetischer Reihenfolge) gesondert bedanken:

- Prof. Dr. Michael Flentje, für das Zustandekommen und die geduldige Durchsicht dieser Arbeit.
- Martin Müller, für sein aktives Zutun, v. a. in der Erstellung und Ausarbeitung des mathematischen Gedankenmodelles.
- Dr. Uli Oppitz, für seine konstruktive und kritische Anleitung und seinen fachlichen, aber auch seinen freundschaftlichen Rat.
- Prof. Dr. Helga Stopper, für ihre Unterstützung bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit.

## Lebenslauf

1978–1982	Grund- und Hauptschule Böbingen a. d. Rems
1982–1991	Hans-Baldung-Gymnasium Schwäbisch Gmünd Allgemeine Hochschulreife
7/1991–9/1992	Zivildienst – DRK Aalen, Abteilung Rettungsdienst
10/1992–3/1993	Humanitäre Hilfe am Lacor Hospital, Gulu, Uganda (Ostafrika)
10/1993–5/1995	Studium der Visuellen Gestaltung an der FH Schwäbisch Gmünd, Hochschule für Gestaltung (HfG)
5/1995–9/2000	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Univer- sität Würzburg Ärztliche Vorprüfung I. und II. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
9/2000–9/2001	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Uni- versität München Ärztliche Prüfung
3/2002–8/2003	Arzt im Praktikum (AiP) an der Universitätsklinik München – Innenstadt, Chirurgischen Klinik und Poliklinik
seit 9/2003	Assistenzarzt an der Chirurgischen Klinik I am Ostalbklinikum Aalen (Ostalbkreis)