



Bundesministerium
für Umwelt, Naturschutz
und Reaktorsicherheit

SCHRIFTENREIHE REAKTORSICHERHEIT UND STRAHLENSCHUTZ

**ERMITTLUNG DER STRAHLENEMPFINDLICHKEIT BEI
PATIENTEN NACH KONDITIONIERENDER BESTRAHLUNG
ZUR VORBEREITUNG EINER KNOCHENMARKS- BZW.
STAMMZELLENTRANSPLANTATION**

BMU - 2005-651



WIR STEuern UM AUF ERNEUERBARE ENERGIEN.

BMU – 2005-651

**„Ermittlung der Strahlenempfindlichkeit bei Patienten
nach konditionierender Bestrahlung zur Vorbereitung
einer Knochenmarks- bzw. Stammzellentransplantation“**

Erhard Severin, Elke Pascher, Burkhard Greve, Niels Wedemeyer, Joachim
Kienast, Normann Willich, Wolfgang Göhde

Westfälische Wilhelms-Universität, Institut für Strahlenbiologie, Rober-
Koch-Str. 43, 48129 Münster

IMPRESSUM

Dieser Band enthält einen Abschlussbericht über ein vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) gefördertes Vorhaben. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BMU übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Eigentümer behält sich alle Rechte an der weiteren Nutzung oder Vervielfältigung des Berichts vor.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BMU übereinstimmen.

Herausgeber:

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit

Referat RS I 2

Postfach 12 06 29

53048 Bonn

ISSN 1612-6386

Erscheinungsjahr: 2005

Universitätsklinikum Münster
Institut für Strahlenbiologie

**Ermittlung der Strahlenempfindlichkeit bei Patienten nach konditionierender
Bestrahlung zur Vorbereitung einer Knochenmarks- bzw.
Stammzelltransplantation**

St.Sch.4211

Abschlußdatum: 30.06.2003

Autoren: Erhard Severin, Elke Pascher, Burkhard Greve, Niels Wedemeyer, Joachim Kienast, Normann Willich, Wolfgang Göhde

Schlussversion vom 6.8.2004

Anmerkung:

Dieser Bericht ist vom Universitätsklinikum Münster im Auftrag des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit im Rahmen des Vorhabens St.Sch.4211 erstellt worden. Die Verantwortung für den Inhalt liegt jedoch allein bei den Autoren. Der Eigentümer behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit Zustimmung des Auftraggebers zitiert, ganz oder teilweise vervielfältigt bzw. Dritten zugänglich gemacht werden.

Dieser Bericht gibt die Meinung und Auffassung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der Meinung des auftraggebenden Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit übereinstimmen.

	Seite
Inhaltsverzeichnis:	5
Kurzfassung deutsch und englisch	6
1. Aufgabenstellung	7
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	9
3. Planung und Ablauf des Vorhabens	9
4. Stand der Wissenschaft und Technik	20
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	21
6. Ergebnisse	21
7. Voraussichtlicher Nutzen	66
8. Fortschritt auf diesem Gebiet bei anderen Stellen	66
9. Anhang	68
Erfolgskontrollbericht	
Einhaltung des Kosten- und Zeitplans	
10. Bisherige Publikationen	70
11. Zitierte Literatur	71

Ermittlung der Strahlenempfindlichkeit bei Patienten nach konditionierender Bestrahlung zur Vorbereitung einer Knochenmarks- bzw. Stammzelltransplantation

Falls die strahlenempfindlichen Individuen vor einer geplanten Bestrahlung identifiziert werden könnten, wäre eine Dosissteigerung bei den übrigen Personen möglich und ihre Heilungsrate wahrscheinlich höher. Deshalb ist die Erprobung solcher Testmethoden dringend erforderlich. Auf der Suche nach einem schnellen und zuverlässigen Labortest zur Vorhersage der individuellen Strahlenempfindlichkeit wurden mehrere Bluttests auf ihre Eignung geprüft: zumeist flusszyometrische Tests an Lymphozyten: Mikronuclei, Zellproliferation, Apoptose Aktivierung von Zytokinen und Gesamtzahl von Leukozyten, Blutstammzellen, CD4+ und CD8+ Lymphozyten, und auch ein spektralphotometrischer Test am Blutplasma zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität. Die Blutproben stammten von 40 ganzkörperbestrahlten Leukämiepatienten vor und nach Bestrahlung (mit 6 MV Röntgenstrahlen fraktioniert mit 4 bis 8 Gy) sowie 7 Leukämiepatienten ohne Bestrahlung und 67 Normalprobanden. Alle unbestrahlten Blutproben wurden sofort untersucht sowie nach in vitro- Bestrahlung mit 100 kV Röntgen. Als strahlenempfindlich wurden die 10 Patienten (= 25 %) mit einer Mucositis 3. und 4. Grades gewertet.

Es wurde festgestellt, dass

- a) die Bestrahlungen in vivo und in vitro tendenziell die gleichen Ergebnisse liefern,
- b) die meisten Tests deutlich dosisabhängige Ergebnisse liefern,
- c) eine verstärkte Nekrose von Lymphozyten und eine reduzierte Leukozytenzahl nach 4 Gy in vitro statistisch mit einer schweren Mucositis einhergeht,
- d) ebenso eine erniedrigte antioxidative Kapazität nach 8 Gy eine schwere Mucositis verbunden ist.

Flow cytometric determination of individual radiosensitivity using blood samples of leukemic patients after irradiation conditioning for a stem cell transplantation

An escalation in standard irradiation dose is estimated to ensure improved local tumor control but this strategy should require the exclusion of the most sensitive individuals from treatment to prevent unacceptable side effects. Thus, fast and reliable assays to predict the individual radiosensitivity are urgently required. On the

search for a quick and reliable method to predict individual radiosensitivity eight different endpoints were investigated. Lymphocytes or blood plasma of 40 patients with leukemia were analyzed after *in vitro* irradiation, and before as well as during *in vivo* total body irradiation. This enables, both, the correlation of data of *in vivo* irradiation (fractionally with 4, 6 and 8 Gy of 6 MV X-rays) and *in vitro* 100 kV X-irradiation as well as the correlation with severe clinical reactions.

The following parameters were analyzed prior and after irradiation: micronucleus formation, cell proliferation, apoptosis, activation of cytokines, and antioxidative capacity of blood plasma. Furthermore, the following cellular blood components were enumerated: total leukocytes, blood stem cells, and CD4+ and CD8+ lymphocytes.

It was found:

- i In vivo and in vitro irradiations show comparable results.
- ii A dose-response relationship is found for most investigated parameters.
- iii An enlarged necrotic proportion of lymphocytes following 4 Gy *in vitro* coincides with severe mucositis.
- iv A reduced antioxidative capacity following 8 Gy TBI coincides with severe mucositis.

1. Aufgabenstellung

Etwa 5 – 10 % der Menschen besitzen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung, selbst wenn sie an keinem der auf genetischen Defekten beruhenden Syndromen leiden, wie z.B. Xeroderma pigmentosum, Ataxia teleangiectasia, Nijmegen Breakage Syndrom oder Retinoblastom. Die Strahlenempfindlichkeit ist zwar genetisch determiniert, sie variiert aber – möglicherweise auch für die Individuen – wahrscheinlich aufgrund exogener Faktoren wie Rauchen, Alkohol, Ernährungsfaktoren und Hygiene (Zimmermann, et al., 1998). Bei den betroffenen, äußerlich unauffälligen Personen, stellt sich die - gegenüber den Erfahrungswerten für die Mehrzahl der Bestrahlten - erhöhte Empfindlichkeit oft erst im Laufe einer Strahlentherapie heraus, was auf Grund inakzeptabler Strahlenschäden an den gesunden Geweben dann zum Abbruch des geplanten Therapieschemas führt. Die prä-therapeutische Kenntnis der individuellen Strahlenempfindlichkeit würde es erlauben, solche Risikopatienten geringer dosiert

zu behandeln, die übrigen aber höher dosiert als zur Zeit üblich, wodurch deren Therapiechancen steigen könnten.

Es liegt die Vermutung nahe, dass eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit auf Grund einer genetisch fixierten oder erworbenen schlechteren Reparaturleistung für DNA-Schäden mit einem erhöhten Krebsrisiko einhergeht; folglich müssten diese Personen auch vor beruflich bedingten Strahlenbelastungen geschützt werden. Es liegt also auch im öffentlichen Interesse, diesen Personenkreis zu identifizieren.

Wenn im folgenden von Strahlenempfindlichkeit die Rede ist, handelt es sich immer um die des Normalgewebes, denn das Normalgewebe ist für die Strahlentherapie dosislimitierend: es muß nach Beendigung der Tumorbestrahlungen funktionsfähig geblieben und zur Regeneration noch befähigt sein. Andernfalls können manche Therapiefolgen nicht nur Einbußen in der Lebensqualität behandelter Patienten bedeuten, sondern auch lebensbedrohliche Auswirkungen haben.

Welche Reaktion kann als Kriterium einer individuell erhöhten Strahlenempfindlichkeit dienen?

In diesem Projekt können nur Zusammenhänge mit der klinisch-akuten Strahlenempfindlichkeit untersucht werden, nicht solche mit möglichen *Spätschäden*, weil das prognostische Überleben der Leukämiepatienten zu ungewiss ist. Weil Ganzkörper-bestrahlten Patienten naturgemäß keine hohen Dosen verabreicht werden, sind allenfalls Strahlenreaktionen der Haut, des Gastrointestinaltraktes und des Blutbildes zu erwarten. Bei Leukämiepatienten können Veränderungen des Blutbildes nur unter großem Vorbehalt allein der konditionierenden Bestrahlung zugeschrieben werden, da auf Grund der Primärerkrankung, verbunden mit der zytostatischen Vorbehandlung, immer von pathologischen Befunden auszugehen ist. Deshalb bietet sich als Kriterium am ehesten das Auftreten verstärkter Schleimhautreaktionen, eine Mucositis, an.

Die Untersuchung ist nicht darauf angelegt, *eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit anhand individuellerer extremer Laborwerte zu beweisen, sondern bei den Blutmessungen auf jene Auffälligkeiten zu achten, die mit einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit zu tun haben könnten. Den Beweis für die nach der jetzigen Studie formulierten Hypothesen muß eine spätere Untersuchung bringen.*

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Damit die Ergebnisse von prä-therapeutischen Tests noch für die Behandlung des jeweiligen Patienten genutzt werden können, dürfen sie nicht lange dauern.

Am häufigsten werden Fibroblasten und Lymphozyten als Material für prädiktive Tests verwendet. Es gibt für die zur Testung verwendeten Gewebe und Zelltypen noch keinen Goldstandard, an dem sich eine für den ganzen Körper repräsentative Strahlenreaktion ablesen ließe.

Untersuchungen zur Ermittlung der individuellen Strahlenempfindlichkeit sind an Strahlentherapiepatienten grundsätzlich möglich, jedoch bei Teilkörperbestrahlungen im Normalfall wegen der Unterschiede der bestrahlten Körpervolumina und der dabei unterschiedlich stark bestrahlten Anteile des peripheren Blutes mit einer erheblichen Streuung der Messwerte verbunden, falls der Test an Blutzellen ablaufen soll. Bei ganzkörperbestrahlten Patienten dagegen sind wegen der nahezu homogen applizierten Dosis eher geringe Streuungen der Strahlenwirkung auf unterschiedliche Zellpopulationen zu erwarten. Es besteht darüber hinaus immer die Möglichkeit einer in vivo- und in vitro-Bestrahlung - was bei Standardbehandlungen sonst nur sehr selten möglich ist - wenn von allen Patienten schon vor der Bestrahlung eine Blutprobe gewonnen und in vitro bestrahlt wird. Für die Reaktionen der in vitro bestrahlten Körperzellen spielt allerdings die chemotherapeutische Vorbehandlung der Patienten eine ungeprüfte Rolle. Deshalb werden die Untersuchungen auch an einer nur chemotherapeutisch behandelten Patientengruppe parallel ausgeführt. Die wichtigste Kontrolle aber ist die unbestrahlte Probe eines jeden Patienten selbst.

Unter diesen Voraussetzungen wurde das Projekt zur Überprüfung der individuellen Strahlenempfindlichkeit durchgeführt. Das Institut für Strahlenbiologie des Universitätsklinikums Münster besitzt eine langjährige Expertise für die Durchführung der erforderlichen zell- und molekularbiologischen Testverfahren.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Medizinische Klinik – Innere Medizin A, Knochenmarktransplantationszentrum, plante zusammen mit der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie – Radioonkologie

der Universitätskliniken Münster zur gleichen Zeit eine klinische Phase I/II-Kohorten-Studie, die überprüfen soll, ob eine Reduzierung der Ganzkörper-Bestrahlungsdosis möglich ist, die zur Konditionierung von Leukämiepatienten vor Empfang einer Stammzellspende zu erfolgen hat. Das Institut für Strahlenbiologie konnte sich mit der Fragestellung der individuellen Strahlenempfindlichkeit an dem Vorhaben des Zentrums beteiligen, wodurch sich für das Institut die großen klinischen Kosten einer solchen Studie einsparen ließen. Ebenso fiel der Aufwand der Begutachtung durch die Ethikkommission nur einmal an.

A Probanden

Gesunde freiwillige Blutspender

Bei diesen Personen handelt es sich um Personal der Institute und Kliniken, sowie um deren Verwandte. Es können nur in vitro-Bestrahlungen ausgeführt werden.

Ganzkörperbestrahlte Patienten

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie und dem Knochenmark-Transplantations-Zentrum des Universitätsklinikums Münster wurden 40 Patienten untersucht, die bei Vorliegen einer Leukämie oder eines Non-Hodgkin-Lymphoms für eine Stammzelltransplantation mit einer Ganzkörperbestrahlung (GKB) konditioniert wurden. Es waren ursprünglich jährlich 20 Patienten, also insgesamt 60 Patienten eingeplant. Diese Anzahl konnte v.a. durch Begrenzung der Behandlungsziffern in der Klinik von Seiten der Krankenkassen in den 3 Jahren nicht erreicht werden.

Unabhängig von dem vorliegenden Projekt lief an den o.g. Kliniken eine Studie zur Reduzierung der bisher üblichen Ganzkörperdosen von 12 Gy auf 4 bis 8 Gy. Für die Studie wurde ein Behandlungsschema festgelegt, das drei Probanden-Kohorten bildete: Kohorte 1: 2 x 2 Gy (jeweils an 2 aufeinander folgenden Tagen = 8 Gy), Kohorte 2: 2 x 2 Gy plus 1 x 2 Gy (= 6 Gy) sowie Kohorte 3: 2 x 2 Gy an nur einem Tag (= 4 Gy). Das Bestrahlungsschema ergibt eine fraktionierte Bestrahlung mit 2 bis 4 Fraktionen innerhalb von 24 oder 48 Stunden. Zwei Patienten in einer (weiteren) Kohorte 4 erhielten noch das alte Bestrahlungsschema mit insgesamt 12 Gy; bei ihnen wurden die Blutproben aber auch nach 4 und 8 Gy entnommen, so dass ihre Labordaten sich mit denen der übrigen vergleichen lassen. Alle Patienten erhielten täglich zusätzlich 3 mg/kg KG Cyclosporin A sowie einmal 15 mg/m² und

dreimal 10 mg/m² Methotrexat sowie 30 mg/m² Fludarabin für drei Tage zur weiteren Immunsuppression. Anschließend wurde ihnen für zwei Tage je 20 mg/kg KG Antilymphozyten-Globulin verabreicht und nach einem weiteren Tag Pause wurde die Stammzelltransplantation durchgeführt, d.h. sieben Tage nach der letzten Bestrahlungsdosis. Bereits vor der Bestrahlung wurde jeweils eine Blutprobe gewonnen, die einerseits als Kontrolle diente, andererseits auch in vitro bestrahlt wurde, womit ein Anschluß an die Daten der Probandengruppe der gesunden freiwilligen Blutspender gelang.

Tabelle 1. Charakteristik der GKB-Patienten (Diagnose, Alter, Geschlecht, Bestrahlungsdosis) und ihre Verteilung auf die Gruppen mit Mucositis der Schweregrade 0 bis 4

Grad der Mucositis	0	1	2	3	4
Anzahl	15	3	12	4	6
Alter (Bereich)	46,5 (17-63)	53.0 (40-61)	46.0 (23-60)	44 (30-64)	49 (30-62)
Geschlecht (m/w)	8 m, 7 w	2 m, 1 w	11 m, 1 w	2 m, 2 w	4 m, 2 w
Erkrankung*	Anzahl der Fälle				
AML	4	2	9	2	4
NHL	8	1	3	-	2
MM	2	-	-	2	-
MDS	1	-	-	-	-
Gesamtdosis	Anzahl der Fälle				
4 Gy	2	-	1	-	-
6 Gy	4	-	3	-	1
8 Gy	9	3	7	4	4
12 Gy	-	-	1	-	1

* AML Akute Myeloische Leukämie, NHL Non-Hodgkin-Lymphom, MM Multiples Myelom, MDS Myelodysplastisches Syndrom

Die Alters- und Geschlechtsverteilung der gesunden Blutspender im Vergleich zu den GKB-Patienten zeigt die **Abbildung 1a und b**, Seite 31 f.

Allein mit Zytostatika behandelte Patienten

Ein besonderes Problem bei der Durchführung und Bewertung der Untersuchungen besteht darin, dass alle Patienten vor der GKB zytostatisch vorbehandelt sind und diese Vorbehandlung zudem heterogen ist. Es ist bekannt, dass viele

Chemotherapeutika eine Mucositis auslösen können oder die Patienten dafür zumindest disponieren können. Andererseits zeigt die klinische Erfahrung mit der kombinierten Strahlen-Chemotherapie den dominierenden Einfluß der Strahlung für die Mucositis. Um aber besser zwischen der eigentlichen Strahlenreaktion und der Reaktion auf die zuvor allen Patienten verabreichte Chemotherapie unterscheiden zu können, wurde versucht, eine Gruppe von 60 nur zytostatisch behandelten Leukämiepatienten der GKB-Gruppe zuzuordnen. Es konnten nur 7 Patienten dafür rekrutiert werden. Fünf dieser Patienten erhielten Busulfan zur Immunsuppression und zwei das Standardregime. Es wurden bei ihnen die gleichen Untersuchungen vorgenommen wie bei den ganzkörperbestrahlten Patienten.

Tabelle 2. Charakteristik der allein chemotherapeutisch behandelten Patienten (Diagnose, Alter, Geschlecht, Bestrahlungsdosis) und ihre Verteilung auf die Gruppen mit Mucositis der Schweregrade 0 bis 4

Grad der Mucositis	0	1	2	3	4
Anzahl	3	0	0	4	0
Alter (Bereich)	64,7 (49-81)	-	-	40,7 (30-57)	-
Geschlecht (m/w)	1 m, 2 w	-	-	2 m, 2 w	-
Erkrankung*	Anzahl der Fälle				
AML	2	-	-	-	-
NHL	-	-	-	1	-
CML	1	-	-	3	-

* AML Akute Myeloische Leukämie, NHL Non-Hodgkin-Lymphom,

* CML Chronisch-Myeloische Leukämie

Einteilung der Mucositis

Die Beurteilung der Mucositis als Kriterium einer gesteigerten Strahlenempfindlichkeit war Bestandteil des allgemeinen Therapiemonitoring für diese Studie anhand der „Common Toxicity Criteria“ des National Cancer Instituts (!988). Veränderungen an der Mundschleimhaut (Code 04.04) werden folgendermaßen beurteilt:

Tabelle 3: Schweregrade der Stomatitis gemäß CTC (NCI)

Schweregrad	Befunde
Grad 0	keine
Grad 1	geringes Wundsein, Erytheme oder schmerzlose Erosionen
Grad 2	schmerzhafte Erytheme, Ödeme oder Erosionen, feste Speise möglich
Grad 3	stark schmerzhafte Erytheme, Ödeme oder Ulzera, Flüssignahrung erforderlich
Grad 4	enterale oder parenterale Ernährung erforderlich

Die Beurteilungen wurden täglich von insgesamt 4 Ärzten vorgenommen und intern regelmäßig gegenkontrolliert, so dass es im Urteil keinen individuellen „Ausrutscher“ geben konnte.

Bestrahlungen

Die Bestrahlungen zur Konditionierung der Patienten für eine Knochenmark- oder Stammzellspende wurden frühestens 6 Wochen nach Absetzen aller chemotherapeutischen Behandlungen appliziert.

Die Ganzkörperbestrahlungen erfolgten am liegenden Patienten mit 6 MV-Röntgenstrahlen – einige beleibte Patienten, insgesamt 6, erhielten 15 MV-Röntgenstrahlen - eines Beschleunigers (Primus, Fa. Siemens) mit 2 Gy je Fraktion zweimal täglich, am Tag 8 und 7 vor der Knochenmark- oder Stammzell-Transplantation. Die Dosimetrie wurde an 6 Punkten des Oberkörpers durchgeführt. Dosisleistung 0,15 Gy/min, FHD 5,8 m. Weil für die vorliegenden Untersuchungen Zellen des zirkulierenden Blutes verwendet wurden, ist davon auszugehen, dass sie bei der etwa halbstündigen Bestrahlungsdauer ebenfalls jeweils 2 Gy erhielten.

Die in vitro-Bestrahlungen wurden durchgeführt mit einem Vollschutzgerät der Fa. Röntgen-Müller mit der Röhre MÖD 150, die ein 1 mm starkes Berylliumfenster besitzt. Bedingungen: 100 kV, 10 mA, 1 mm Al, Abstand 31 cm, Dosisleistung 1,67 Gy/min. Die Blutproben befanden sich in Plastik-Petrischalen der Fa. Nunc, je 0,3 ml in 4 ml RPMI-Medium, das mit 10 % fetalem Kälberserum und Antibiotika versetzt worden war, und wurden anschließend im Brutschrank gehalten oder fixiert.

Einige Bemerkungen zur Vergleichbarkeit der Strahlungen:

Offiziell haben alle drei verwendeten Strahlenarten (6 und 15 MV-Röntgenstrahlen in vivo und 100kV-Röntgenstrahlen in vitro) die Relative Biologische Wirksamkeit (RBW) = 1. In der Praxis wird das für die beiden hochenergetischen

Röntgenstrahlungen wohl auch stimmen. Die 100 kV-Röntgen in vivo sind je nach Strahlenreaktion unterschiedlich zu bewerten: für Mutationen $RBW = 1,8$ (Göhde et al. 2003), für Transformationen und Chromosomenschäden $RBW = 2-3$ (UNSCEAR 1993) oder noch höher, für Zellüberleben $RBW = 1-2$ (Frankenberg et al. 2002). Diese letzte Reaktion spielt für die Ätiologie der Mucositis die entscheidende Rolle. Für die Beurteilung der Dosis-Wirkungsbeziehung bei der Mucositis hat deshalb die Frage der Genauigkeit der Dosis infolge unterschiedlicher RBW eine geringere Bedeutung als die Genauigkeit der Mucositis-Beurteilung. Diese hat wahrscheinlich einen größeren Fehlerspielraum als die RBW-Abschätzung im konkreten Fall.

B Laboruntersuchungen:

Am peripheren Blut fanden folgende Untersuchungen statt, die in dem Schema übersichtlich dargestellt sind:

Projekttablauf

Blutprobe **unbestrahlter** Patienten oder Probanden

Vollblut

- Zählung von Leukozyten
- Zählung von CD34-Stammzellen und CD4-, CD8-Lymphozyten

Bestrahlung mit 2-8 Gy

- RNA-Isolierung → Zytokine
→ Mikronuklei in Lymphozyten

Lymphozyten

- Mikronuklei, direkt
- Apoptose, direkt

Bestrahlung mit 2-8 Gy

- Apoptose nach 72 h
→ Proliferation

Blutplasma

- antioxidative Kapazität

Blutprobe **bestrahlter** Patienten

ebenso,
aber ohne in vitro-Bestrahlung

3.1. Methode Leukozytenzählung

In der Routine werden Vollblutproben bei annähernd normalen Leukozytenwerten mit einem Hämatologiecounter zuverlässig gezählt. Unterhalb von 100 Leukozyten pro Mikroliter sind Hämatologiecounter nicht mehr in der Lage genau zu zählen. Daher wurden in dieser Arbeit kernhaltige Zellen mit einer einfachen DAPI-Färbung DNA-spezifisch markiert und mit dem Durchflußzytometer gezählt. Das Institut für Strahlenbiologie verfügt über eine neue volumetrische Technik zur Absolutzählung von Zellen. In Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Daten ist die volumetrische Durchflußzytometrie den meisten anderen Zähltechniken überlegen (Cassens et al. 2002).

3.2. Methode Zählung von Blutstammzellen (CD 34+) und von CD4- und CD8-Lymphozyten

Die Existenz des CD34-Antigens ist abhängig vom zellulären Differenzierungsgrad. Das Antigen kennzeichnet Zellen in frühen Stadien der Hämatopoese, die Blutstammzellen. Diese Stadien findet man hauptsächlich im Knochenmark, sie können aber auch im Vollblut nachgewiesen werden. Unter normalen Bedingungen beträgt der Anteil der Stammzellen im Blut nur ca. 0,01% - 0,1%. Zur Vorbereitung auf eine Stammzell-Transplantation werden alle CD34-Zellen (und damit auch die leukämischen Zellen) mit einer Ganzkörperbestrahlung und hochdosierten Chemotherapie in Blut und Knochenmark getötet. In diesem Projekt wurden die Stammzellen im Blut von Patienten vor und nach Ganzkörperbestrahlung (GKB) quantifiziert. Die Zählung erfolgte nach simultaner Markierung mit CD34- und CD45-Antikörpern; die CD45 Markierung ist erforderlich, um zu prüfen, ob es sich bei den gezählten Zellen tatsächlich um Leukozyten handelt. Es wurde folgendes Färbe- und Meßprotokoll eingesetzt:

- 100 µl EDTA-Vollblut wurden mit 10 µl CD34-Antikörpern (gekoppelt an Phycoerythrin) und mit 10 µl CD45-Antikörpern (gekoppelt an FITC (Fluoresceinisothiocyanat)) für 15 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

- Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Paraformaldehyd für 10 min. im Dunkeln fixiert.
- Erythrozyten wurden durch ein Lyseagens zerstört, so dass nach ca. 25 min. die Messung am Durchflußzytometer erfolgen konnte.

Nach dem gleichen Protokoll wurden die CD4- und CD8-positiven T-Zellen im Blut gezählt, indem spezifische Antikörper gegen CD4 und CD8 verwendet wurden (Abb.2).

3.3. Methode Mikronuklei

Mikronuklei können durch chemische oder physikalische Einflüsse u.a. auch durch ionisierende Strahlung induziert werden. Ihre Anzahl steht in direktem Zusammenhang mit der Häufigkeit von Doppelstrangbrüchen und anderen schweren DNA-Schäden. Der Mikrokern-Test wird daher allgemein als Mutagenitätstest akzeptiert.

Mikronuklei sind runde, membranumschlossene Kernfragmente im Zytoplasma außerhalb des Hauptkerns. Sie enthalten fragmentierte Chromosomen oder ein oder mehrere ganze Chromosomen. Die Induktion der Mikrokerne korreliert mit der zellulären DNA-Reparatur d. h. bei Überlastung des zellulären Reparatursystem werden während der mitotischen Zellteilung vermehrt Mikrokerne gebildet.

Die mikroskopische Zählung der Mikrokerne ist sehr aufwendig. Leukozytenkulturen werden hierzu unter Zusatz von Cytochalasin B inkubiert. Diese chemische Substanz verhindert die letzte Phase der mitotischen Teilung, so dass teilungsaktive Zellen die Mitose nicht abschließen können und zwei Zellkerne besitzen. Ausschließlich in diesen dikaryotischen Zellen wird die Zahl der Mikrokerne mit dem Mikroskop bestimmt. Einige automatisierte Verfahren haben gerade bei der Abgrenzung der Mikrokerne von Zellbruchstücken (Debris) Probleme. Daher wurde in dieser Studie ein Verfahren gewählt, bei dem nicht die abgetrennten Mikrokerne selbst, sondern die verbleibenden Restkerne mit einem Durchflußzytometer (FCM) gezählt wurden, indem auf Grund einer DNA-Messung Zellkerne mit vermindertem DNA-Gehalt identifiziert wurden. Dazu wurden die Blutproben folgendermaßen behandelt:

- Vollblut wurde unter Zusatz von Phytohämagglutinin im CO₂-Inkubator kultiviert.

- Nach 48 h wurden die Leukozyten über eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficoll isoliert und mit DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindol) gefärbt.
- Innerhalb von 10 min. erfolgte die durchflußzytometrische Messung.

Mit dem Durchflußzytometer ist es möglich, die DAPI-Fluoreszenz bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen zu messen. Diese vereinfachte „Spektralanalyse“ jedes einzelnen Fluoreszenzsignals erlaubt es, sehr viel genauer zwischen intakten Zellkernen und DNA-haltigen Bruchstücken zu unterscheiden. Die Zahl der Mikrokerne, die sich innerhalb eines Auswertefensters von 10 bis 90 % des diploiden DNA-Gehalts eines Lymphozyten befinden, wurde bestimmt und zur Gesamtzahl der gemessenen zellulären Ereignisse in Bezug gesetzt (Abb.3).

3.4. Methode Apoptose

Strahlenbedingte DNA-Schäden können den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen. Der damit verbundene DNA-Abbau lässt sich mit verschiedenen Färbemethoden durchflusszytometrisch nachweisen. Färbungen mit Annexin V-FITC zusammen mit Propidiumjodid waren nicht so zuverlässig wie eine einfache DNA-Proteinfärbung mit DAPI/SR (Sulforhodamin). Dieses Verfahren ermöglicht die gleichzeitige Unterscheidung apoptotischer, nekrotischer und intakter Zellen. Zellen verlieren während der Apoptose DNA, sichtbar an der Linksverschiebung, bei gleichbleibendem oder sogar erhöhtem Proteingehalt. Nekrotische Zellen dagegen verlieren DNA und Protein gleichzeitig und man findet sie unterhalb des Fensters für apoptotische Zellen. Außerdem lässt sich aus der DNA-Verteilung ein Proliferationsindex berechnen, indem ein Quotient aus der Zellzahl mit hyperdiploiden DNA-Werten und der Gesamtzellzahl gebildet wird (Abb.4).

3.5. Methode Zellzyklusphasen-Progression

Strahleninduzierte Schäden können durch spezifische Reparaturenzyme eliminiert werden. Während der Reparatur teilen sich die geschädigten Zellen nicht, so dass sich die Zellkinetik einer bestrahlten Probe dosisabhängig ändert. Auch diese Reaktion könnte einen Hinweis auf eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit liefern.

Leukozyten wurden durch Phythämagglutinin zur Teilung angeregt, 24h nach der Blutentnahme in vitro bestrahlt und für 64h mit 5-Bromdesoxyuridin (BrdU) kultiviert. Wird BrdU zu einer wachsenden Zellkultur gegeben, so wird es statt Thymidin in die DNA eingebaut und kann dann über eine Farbreaktion oder über einen Antikörpernachweis nachgewiesen werden.

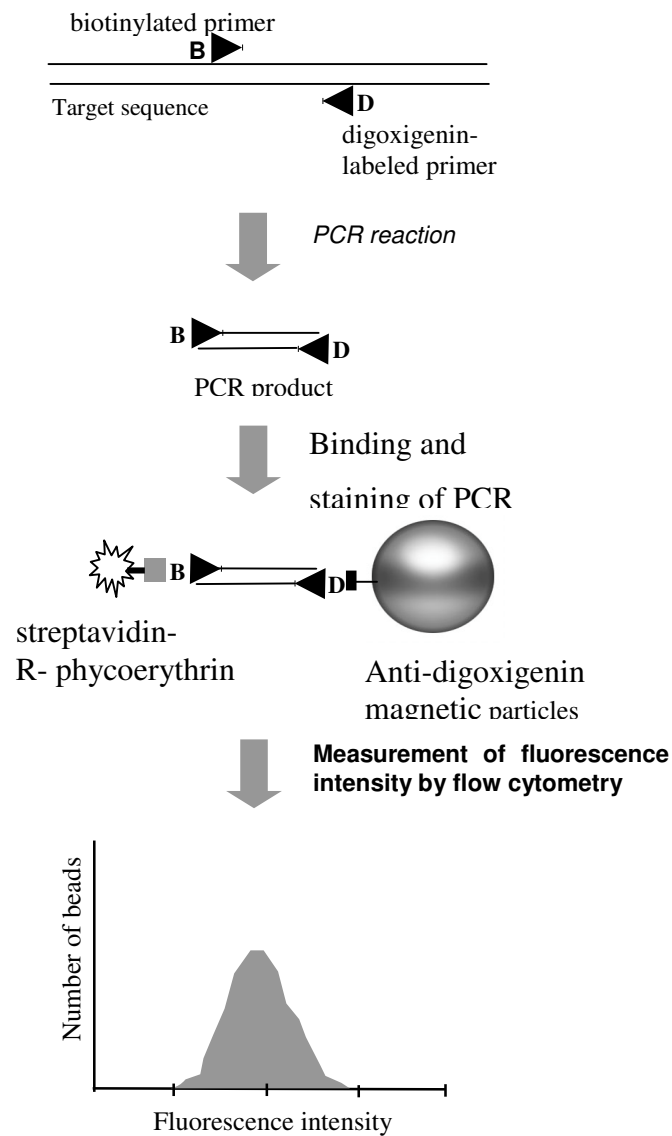
Der Eintritt der Zellen in den zweiten Zellzyklus wurde durch die Verminderung der Kernfluoreszenz nach Fluorochromierung mit Hoechst-33258 und Ethidiumbromid nachgewiesen. Der Farbstoff Hoechst-33258 bindet spezifisch an AT-Basenpaare. Weil in teilungsaktiven Zellen BrdU statt Thymidin eingebaut wird, stehen in diesen Zellen weniger Bindungsstellen für den Hoechst-Farbstoff zur Verfügung als in nicht teilungsaktiven Zellen. Die Folge ist, dass die Hoechst-Fluoreszenz in teilungsaktiven Zellen gegenüber der gleichzeitig durchgeführten Ethidiumbromid-Färbung gelöscht wird und die Teilungsaktivität mit diesem Effekt mit Hilfe des Flow Cytometers quantitativ erfasst werden kann (Abb.5).

3.6. Methode Zytokine

Zytokine sind als biologische Reaktionsmodifikatoren bekannt. Die Zytokine spielen für die Induktion zellulärer radioprotektiver Mechanismen nach Bestrahlung eine wesentliche Rolle.

Die Expression entsprechender Gene vor und nach Bestrahlung von Lymphozyten wurde mittels Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) erfasst und mit einer Mikropartikel-Technik am FCM semiquantitativ gemessen. Es wurden Exon-Exon-überlappende Primer für die Interleukine IL-6, IL-8 und Interferon IFN γ eingesetzt, um bei der PCR auftretende Störungen infolge Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen. Für die erwähnten Gene wurden PCR's von sämtlichen Proben durchgeführt und mittels Agarosegel analysiert. Außerdem wurde als Referenzgen das pseudogenfreie und tatsächliche „housekeeping“-Gen Porphobilinogen-Desaminase (PBDA) gemessen. Amplifikationsprodukte aus der exponentiellen Phase der PCR wurden durch das neue, im Institut für Strahlenbiologie entwickelte Verfahren (Wedemeyer, et al., 2002) quantifiziert. Das Verfahren erlaubt eine schnelle, billige und sensitive Quantifizierung des Expressionsniveaus beliebig vieler Gene. Das Verfahren nutzt die spezifische Bindung von Amplifikationsprodukten an

Mikropartikel (Beads) für die sich anschließende automatisierte Auswertung mit dem Durchflusszytometer.



Schema: **Arbeitsablauf zur Messung der Zytokine**

3.7. Methode Antioxidative Kapazität als funktioneller Parameter

In diesem Teilprojekt wurde nur der extrazelluläre, weil leichter messbare Anteil der Antioxidativen Kapazität im frischen oder frisch eingefrorenen Blutplasma bestimmt. Es wurde der auch von der Lebensführung des Probanden abhängige Blutspiegel an körpereigenen Strahlenschutzstoffen erfasst. Dafür wurden nun nicht die

Konzentrationen der wichtigsten Antioxidantien (Harnsäure, Bilirubin, SH-gruppenhaltige Proteine, sowie Vitamin C und E) jeweils einzeln, sondern deren Integralwert mit einer einzigen Messung ermittelt. Mit zwei Testverfahren (ABTS-Methode von Miller und Rice-Evans, 1999, modifiziert nach Re, et al., 1999, und TPTZ-Methode von Benzie und Strain, 1999) wurde die jeweils am Bestrahlungstag aktuelle Antioxidative Kapazität im Blutplasma spektralphotometrisch bestimmt. Benötigt werden nur geringe Serummengen von 10 bzw. 50 µl, deren Gehalt an reduzierenden und radikalfangenden Substanzen die der Messprobe zugefügten (je nach Methode unterschiedlichen) Radikale neutralisiert, was einen Farbumschlag ergibt und mit Hilfe einer Standardkurve in Millimol umgerechnet werden kann.

Es wurde jeweils eine Probe vor der GKB und 24 Stunden nach der letzten Bestrahlungsfraction untersucht. Der Vergleich der zeitlich versetzten Messungen erlaubt die Aussage darüber, inwieweit sich die Antioxidative Kapazität durch die Bestrahlung erschöpft.

Die absoluten Werte je Probe müssten durch Korrelation mit den anderen Messparametern dieses Projekts und mit den klinischen Befunden der Strahlenreaktionen eine Aussage zulassen, ob die Antioxidative Kapazität des Blutes tatsächlich mit der Strahlenempfindlichkeit zusammenhängt. Das wurde bisher des öfteren postuliert, konnte aber mangels Fakten nie demonstriert werden.

4. Stand der Wissenschaft und Technik

Dass die individuelle Strahlenempfindlichkeit seit mehr als 10 Jahren von Strahlenmedizinern zunehmend wichtig genommen wird, ist an der großen Anzahl von Publikationen ersichtlich (Bentzen, S.M., 1997, Bartelink, H. et al., 1999, Begg, A.C. et al., 1999, Crompton, N.E. und Oszahin, M., 1997, Kiltie, A.E. et al., 1999, Oppitz, et al., 2001, West, C.M.L., et al., 1998), die sich mit einer Fülle unterschiedlicher Testmethoden auseinander setzen (Borgmann, et al., 2002, Budach, W. et al. 1998, Coco Martin, J.M., et al., 1999, Dikomey et al., 2003, Fertl, B. und Deschavanne, P.J., 1999, Hoffman, R.M., 1991). Klinische Strahlenreaktionen sind v.a. Mucositis, Teleangiektasie und Fibrose, die mit dem CTC-Score (Common Toxicity Criteria nach National Cancer Institute, USA, 1988) ermittelt werden und allerdings wie die Xerostomie in erster Linie Spätreaktionen darstellen.

Frühreaktionen sind Mucositis, Blutbildveränderungen und Symptome des Magen-Darm-Traktes. Diese Nebenwirkungen am normalen Gewebe nach einer ansonsten erfolgreichen Tumorthherapie beeinträchtigen nicht nur die Lebensqualität, sondern z.T. auch das Langzeit-Überleben. Die publizierten Ergebnisse zum Zusammenhang solcher Früh- oder Spätreaktionen des Normalgewebes des einzelnen Patienten mit der applizierten Strahlendosis, mit der Tumorkontrolle oder mit molekularbiologischen Parametern der getesteten Zellen sind widersprüchlich: Teilweise liegt es an zu kleinen Patientengruppen, teilweise an den untersuchten Reaktionen und Kriterien selbst. Oft überlappten sich die Ergebnisse der Testparameter so stark, dass keine eindeutige Aussage möglich war. Gerade beim heutigen Therapiestandard ist die Häufigkeit extremer Reaktionen selten und damit die Wahrscheinlichkeit eingeschränkt, überempfindliche Personen zu finden, so dass diese Gruppe in den Studien oftmals sehr klein ist.

So ist es nicht verwunderlich, dass die Möglichkeit einer prä-therapeutischen Testung der individuellen Strahlenempfindlichkeit von einigen Radiologen inzwischen pessimistisch gesehen wird (Bentzen, 1997, Dikomey et al., 2003). Gegenwärtig wird – trotz großen Interesses - üblicherweise vor Beginn einer geplanten Strahlentherapie kein derartiger Test durchgeführt, sondern lediglich nach Anzeichen einer gesteigerten Empfindlichkeit gefragt und in der Krankengeschichte des Patienten geforscht.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die klinischen Befunde der Patienten wurden von Frau Dr. Gerda Silling und Herrn U. Ludwig, Medizinischer Dokumentar, beide tätig am Knochenmarktransplantations-Zentrum, gesammelt und für die Studie aufbereitet.

Es bestand eine Zusammenarbeit mit Herrn Dipl. Phys. Gerhard Goder aus dem Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik, der die Auswertung und statistische Bearbeitung der Fragestellung anleitete und die Ergebnisse und ihre Darstellung kontrollierte.

Die statistische Analyse der Labordaten und klinischen Befunde wurde mit den nichtparametrischen Tests nach Kruskal-Wallis, Mann-Whitney und Wilcoxon vorgenommen.

6. Ergebnisse

Blutproben von 40 Probanden wurden vor und nach GKB gemessen, sowie nach in vitro-Bestrahlung. Außerdem wurde das Blut von 67 Normalprobanden sowie von 7 Leukämiepatienten nach alleiniger Chemotherapie (jeweils vor und nach in vitro-Bestrahlung) auf die einzelnen Untersuchungsparameter hin analysiert. Die Einzelergebnisse der jeweiligen Teilprojekte wurden mit den klinisch beobachteten Schleimhautreaktionen der Patienten korreliert, um eine statistisch gesicherte Aussage zu gewinnen, welche der einzelnen Laboruntersuchungen mit einer verstärkten Reaktion einherging. Als Kennzeichen einer erhöhten Empfindlichkeit galt in der vorliegenden Studie eine früh auftretende Mucositis dritten oder vierten Grades. Dieser Befund trat bei 10 der 40 bestrahlten Patienten auf: Mucositis dritten Grades war viermal als Maximalreaktion nach $13,4 \pm 2,4$ Tagen zu beobachten, vierten Grades bei 6 Patienten nach $16,2 \pm 2,9$ Tagen. Diese hohe Mucositisrate erklärt sich dadurch, dass alle Patienten bereits im Laufe ihrer Behandlung vor der Bestrahlung, nun aber zusätzlich vor der Transplantation zur Immunsuppression hoch dosiert chemotherapeutisch behandelt worden sind, was eine Disposition der Patienten für Mucositis bewirkt. Die deutlich *dosisabhängige* Auslösewahrscheinlichkeit in Abbildung 6a zeigt aber, dass die Mucositis in diesen Fällen in erster Linie als Strahlenreaktion zu bewerten ist. Dass die *maximale* Ausprägung der Mucositis außerdem auch zeitabhängig ist (Abb.6b), läßt sich pathophysiologisch leicht erklären.

6.1. Zellzahlen - Leukozytenanzahl

Nach GKB stieg die mittlere Anzahl der Leukozyten bei 85 % der Patienten sofort an, von 4615 auf 7847 / μl . Bei näherer Betrachtung wurde deutlich, dass dies zugunsten der Granulozyten geschah (p 0,015 bis 0,045), während die Lymphozyten- und die Monozyten-Population abnahmen. Die Gruppen ohne Bestrahlung (Abb.7a) unterschieden sich deutlich untereinander, nicht nur in Abhängigkeit einer später möglichen Mucositis, sondern v.a. auf Grund ihres Gesundheitsstatus: Die Werte der Normalpersonen streuen nur gering (bis auf zwei: ein unerklärlicher Extremwert und ein noch höherer Ausreißer-Wert einer Person, bei der kurze Zeit später eine lebensbedrohliche Immunerkrankung ausbrach). Die Mittelwerte der GKB-Patienten

liegen wegen (?) der Zytoreduktion leicht darunter, allerdings sind die Zahlen für 3 der NHL-Patienten extrem hoch; die Werte für die Chemotherapie-Patienten schwanken extrem.

Die statistische Analyse ergab, dass eine Mucositis bei denjenigen ganzkörperbestrahlten Patienten wahrscheinlicher auftrat, die niedrige mittlere Leukozytenwerte hatten (2462 ± 1705 , vgl. Abb.7b) statt höhere (5309 ± 5362). Eine Ausnahme in der 4-Gy-Mucositisgruppe ($> 20.000 / \mu\text{l}$) betrifft eine AML-Patientin, deren Leukozytenwerte vor der Bestrahlung noch bei $6000/\mu\text{l}$ gelegen hatten.

Wird die Gruppe der GBK-Patienten nach ihrer Grunderkrankung aufgeteilt (ohne die 5 Patienten mit MDS bzw. MM weiter zu berücksichtigen) und wird der statistische Test für die 20 AML-Patienten wiederholt, ist keine Signifikanz für Mucositis mehr zu erkennen, was auch der Boxplot Abb. 7c wiedergibt. Der Ausreißerwert für Fall-Nr.95 betrifft eine Patientin mit Mucositis 4. Grades nach 8 Gy. In der Gruppe der 15 NHL-Patienten (Abb.7d) bleibt allein für die 4-Gy-Dosis ein schwach signifikanter Zusammenhang bestehen ($p 0,028$). Ob dieser Signifikanz-Verlust nach Teilung der Gruppen auf einer zu klein werdenden Gruppengröße beruht, müsste eine weitergehende Untersuchung klären. Die Extremwerte und Ausreißer Nr. 101 und 102 betreffen 2 Patienten ohne bzw. mit Mucositis 1. Grades.

6.2. Blutstammzellen und T-Lymphozyten

In den Fällen, in denen sich Blutstammzellen in unbestrahlten GKB-Patienten nachweisen ließen, nahmen sie nach der Bestrahlung zumeist innerhalb eines Tages ab (Abb.8). Es besteht kein statistischer Zusammenhang der Zellzahl mit dem Auftreten einer Mucositis.

Mittels einer Immunphänotypisierung mit spezifischen Antikörpern erfolgte die Zählung der CD4- und der CD8-positiven Zellen (Abb. 9a–c). Während die mittleren CD4-Werte bei Gesunden höher sind als die CD8-Werte (Abb. 9b), ist es bei den unbestrahlten Patienten umgekehrt (Abb.9a). In den Patientenproben nahmen all diese Zelltypen nach in vivo- Bestrahlung drastisch ab, jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied für Patienten mit und ohne Mucositis. Die Daten der Chemotherapie-Patienten (Abb.9c) sind wegen ihrer geringen Anzahl ohne Aussagekraft.

6.3. Mikrokerne

Nach in vitro-Bestrahlung und 72stündiger Inkubation zeigen die Proben der Patienten eine relativ geringere Erhöhung der Mikrokernzahl als Normalprobanden (Abb.10a und b). In beiden Gruppen liegen die Messwerte jedoch unerklärlicherweise viel zu hoch, zwischen 30 und 60 %. Die 24h nach in vivo-Bestrahlung direkt aus der Blutprobe ermittelten Werte hingegen sind insgesamt viel niedriger (zwischen 0 und 3 % bei 0 Gy und 1 bis 6 % nach 8 Gy) und damit auch realistischer als die anderen Werte. Wahrscheinlich hat allein schon die Inkubation des Vollbluts über insgesamt 72h (das sind 24h vor und 48h nach der Bestrahlung), die nach in vitro-Bestrahlung notwendig ist, um zumindest eine Mitose abzuwarten, die vielen Schäden an den Zellkernen gesetzt, die zumindest von unserem flußzytometrischen Auswertungsverfahren erkannt wurden. Trotz dieser zu hohen Werte auf Grund einer offenbar fehlerhaften Kultivierung laufen die Kurven in allen Diagrammen nahezu parallel, was wir als Beweis für die zuverlässige und reproduzierbare *Messung* der Micronuclei mit dem Durchflußzytometer interpretieren. Aber auch eine *Bestimmung* der Micronuclei direkt aus dem Blut der einen oder zwei Tage zuvor in vivo bestrahlten Patienten lieferte *keinen statistischen Hinweis* auf einen Zusammenhang der Mikrokernhäufigkeit mit der Mucositis der Patienten. Der einzelne mit 28 % Mikronuklei sehr hohe Meßwert in Abb. 10c stammt von einer mit 8 Gy bestrahlten NHL-Patientin mit schwerer Mucositis 4. Grades, er ist aber statistisch als „Ausreißer“ zu bewerten. Die Rate der Micronuclei in der Gruppe der 7 Chemotherapie-Patienten ist zum Vergleich mit den anderen Patienten in Abb.10d dargestellt.

6.4. Apoptoserate

Bei allen Normalprobanden wird ein Anstieg der Apoptoserate nach Bestrahlung beobachtet. Die Apoptoseraten der Normalprobanden bilden eine homogene Gruppe, während die der Patienten über einen weiten Bereich streuen (Abb.11a), wobei die Messungen offensichtlich zuverlässig sind, wie Abbildung 11b demonstriert: Die Messwerte sind für jede individuelle Person sehr einheitlich. Der Verlauf der Kurven für den einzelnen Patienten steigt dosisabhängig leicht an und besitzt jeweils eine individuell charakteristische Bandbreite der Apoptosewerte. Bei aller Genauigkeit erlauben die Werte jedoch *keine statistische Aussage über das spätere Auftreten einer Mucositis*. Die Werte der Chemotherapie-Patienten (Abb.11c)

bewegen sich im gleichen Rahmen wie die der GKB-Patienten und besitzen schon auf Grund der niedrigen Anzahl keine statistische Signifikanz. Es liegt sicherlich an der zytostatischen Vorbehandlung, dass die Werte beider Patientengruppen – sowohl unbestrahlt als auch bestrahlt - durchschnittlich doppelt so hoch sind wie die der Normalprobanden.

Auch bei der Apoptosemessung beeinflusst die Art der Vorbehandlung die Höhe der Messwerte: Eine Messung nach 72stündiger Inkubation erhöht die Mittelwerte unbestrahlter Normalprobanden von 3,4 % auf 12,3 % (Abb. 11d) und um das etwa Dreifache bei Patienten (hier erkennbar beim Vergleich der 0 Gy-Werte in Abb. 11b und 11c). Der einzelne hohe Ausreißerwert bei 0 Gy von etwa 50 % (= Nr.57) in Abbildung 11d ist für einen Normalprobanden unerklärlich. Er betrifft einen Spender, der an 4 weiteren Untersuchungsterminen annähernd normale Apoptosewerte hatte. Ein weiterer Extremwert (Nr.106) betrifft einen 89jährigen gesunden Mann, der in den in vitro bestrahlten Proben bei allen Dosen hohe Ausreißerwerte für Apoptosen aufwies. Ein weiterer Extremwert (Nr.76) stammt von einer 44jährigen Frau ein Jahr nach Operation unter Nachbehandlung mit Tamoxifen wegen Mammakarzinom, aber ohne Bestrahlung und Chemotherapie.

Nekrosen

Die Nekroserate wird mit derselben Messung analysiert wie die Apoptosen (vgl. Abb.4). Die Kurvenverläufe für die einzelnen Normalprobanden (Abb.12 a) sind nicht ganz so glatt wie die der Micronuclei. Es finden sich keine Gründe für die Extremwerte und Ausreißer (Abb. 12c, Mitte). Sie betreffen andere Personen (mit Ausnahme des 89jährigen) als bei den Apoptosen.

Bei den GKB-Patienten verlaufen die individuellen Dosis-Wirkungskurven (Abb:12b) sehr einheitlich, die Medianwerte und Standardabweichungen sind aber beträchtlich höher als bei den Kontrollen (Abb.12c). Die extrem hohen Werte in der Gruppe der GKB-Patienten stammen von zwei NHL-Patienten. Die Chemotherapie-Patienten verhalten sich ähnlich, ihre Daten besitzen wegen der geringen Anzahl allerdings keine Signifikanz (Abb. 12e). *Die Nekrosedaten der GKB-Patienten jedoch zeigen nach in vitro-Bestrahlung eine hohe Vorhersagewahrscheinlichkeit für Mucositis (p 0,008 bis 0,031, je nach Strahlendosis, Abb.12d).*

Proliferation

Die Bestimmung der Proliferationsrate der Lymphozyten nach *in vitro*-Bestrahlung ergab Kurvenverläufe, die auf eine dosisabhängige Verminderung der Proliferation hinweisen (Abb.13a). Das gilt für die Normalprobanden und GBK-Patienten, nicht aber für die Chemotherapie-Patienten (Abb.13b), bei denen für ein positives Ergebnis wohl die Anzahl zu gering ist. Die großen Streuungen dieser Daten für alle Messungen lässt beim Test auf Korrelation mit dem Mucositis-Schweregrad nur für die unbestrahlten GKB-Patienten eine schwach signifikante Aussage ($p = 0,033$) zu (Abb.13c).

6.5. Zellzyklusphasen-Progression

Die Korrelation der Phasenprogression mit dem Alter ergab, dass mit steigendem Alter der Probanden die Phasenprogression abnimmt (Abb.14a). Das ist ein Ergebnis, das nicht überrascht. Das Gleiche gilt für bestrahltes Blut. Den Erwartungen entsprechend trat nach Bestrahlung die dosisabhängige Verzögerung der Zellzyklusphasenprogression noch deutlicher ein. Diese war für die einzelnen Personen charakteristisch, d.h. es gab eine gleichmäßige Abnahme. Sie war bei Normalprobanden nach *in vitro* - Bestrahlung (Abb.14b und c) im Mittel doppelt so stark wie bei Patienten. Nach Korrelation dieser Werte mit der Anzahl der proliferierenden Zellen im unbestrahlten Zustand zeigte sich darüber hinaus, dass die Verzögerung der Phasenprogression um so stärker war, je mehr Zellen in der Kontrolle proliferierten. Die Boxplot-Darstellung in Abbildung 14d demonstriert zusammenfassend, dass kein Zusammenhang mit der Mucositis besteht. Denn die Unterschiede in der 1. Gruppe der Darstellung = Normalprobanden ohne Mucositis und bei den GKB-Patienten in der 2. (keine oder schwache Mucositis) zur 3. Gruppe (schwere Mucositis) sind wegen der großen Streuung nicht signifikant (vgl. Tabelle 4) und können deshalb nicht als Kriterium zur Vorhersage einer Mucositis dienen.

6.6. Zytokine

Die Expression der Zytokine IL-6, IL-8 und IFN γ wird durch Bestrahlung beeinflusst. Die Quantifizierung der insgesamt über 2000 PCR-Produkte mit dem Durchflußzytometer ergab extrem streuende Aktivitätsänderungen der einzelnen Zytokine für die Zeit 1 h nach *in vitro*-Bestrahlung. Keine Aktivitätsänderung ist

eindeutig dosisabhängig, mit Ausnahme des IFN γ bei Normalprobanden (p 0,001 bis 0,009). Es wird versucht, die Fülle der Daten für alle Probandengruppen und Zytokine getrennt in Boxplots der Abbildungen 15a bis 15f zusammenfassend und übersichtlich darzustellen. IL-8 und IFN γ werden bei den meisten Personen durch Bestrahlung leicht aktiviert, das Kontrollgen, die Porphobilinogen-Deaminase, hingegen bleibt zumeist unverändert, das IL-6 verhält sich sehr uneinheitlich. Der Vergleich der Aktivitätsänderung zwischen den Gruppen ergab nur für das Interferon - dort für alle Bestrahlungsdosen - bei Normalprobanden und Chemotherapie-Patienten signifikant schwächere Aktivitäten (p zwischen 0,002 und 0,024) als für die GKB-Patienten. Die sehr geringen Aktivitäten des IL-8 bei den Chemotherapie-Patienten fallen auf, sie besitzen aber wegen der geringen Gruppengröße keine Signifikanz für eine Vorhersage einer Mucositis. Die *in vivo*-Bestrahlung der Patienten führte zu keinen statistisch auffälligen Änderungen der Zytokinaktivierung. Es gab auffällige Korrelationen zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Bestrahlung für IFN γ (p 0,000 bis 0,017), IL-8 (p 0,028 bis 0,045) und IL-6 (p 0,002), nicht aber für das Kontrollgen PBDA. *Keine Aktivitätsänderung war statistisch irgendwie mit dem Auftreten einer starken Mucositis verbunden.*

6.7. Antioxidative Kapazität

Der Wirkungsmechanismus einer ionisierenden Bestrahlung besteht im ersten Schritt in der Erzeugung angeregter Moleküle und Radikale. Die Fähigkeit, solche Produkte zu eliminieren, hängt von der Konzentration intrazellulärer Strahlenschutzstoffe ab. Diese sind gleichzeitig Komponenten der „antioxidativen Kapazität“ des Körpers, die intra- und extrazellulär lokalisiert ist.

Die Normalwerte für den ABTS-Test liegen bei $1,05 \pm 0,05$ mMol, die für den TPTZ-Test bei $0,85 \pm 0,16$ mMol. Diese Werte hängen nicht vom Alter ab (Abb.16a), wohl aber für den TPTZ-Test vom Geschlecht (Abb.16b). Für Frauen ist die mit diesem Test gemessene Kapazität $0,71 \pm 0,16$ mMol, die für Männer $0,94 \pm 0,2$ mMol. Der Unterschied liegt am höheren Harnsäurespiegel im Blut der Männer, der für den TPTZ-Test eine dominierende Rolle spielt. Da Zigarettenrauch gewaltige Mengen freier Radikale produziert, welche die Antioxidative Kapazität theoretisch belasten sollten, wurde der Einfluß des Rauchens geprüft: er ist unerheblich, wie Abbildung 16c zeigt.

Die Antioxidative Kapazität nimmt erwartungsgemäß nach Bestrahlung ab, da die Antioxidantien für die Eliminierung der Bestrahlungsprodukte verbraucht werden. Das erkennt jedoch nur der TPTZ-Test - die Medianwerte nehmen dosisabhängig ab - nicht aber der ABTS-Test (Abb. 16d). *Die Abbildung 16d stellt auch den signifikanten Unterschied heraus für Patienten, die keine oder eine nur leichte Mucositis bekommen, gegenüber denen mit einer zumeist nach 16 Tagen auftretenden schweren Mucositis.* Die Blutwerte vor der Bestrahlung lieferten mit keiner der beiden Testmethoden einen Hinweis auf eine später eintretende Mucositis als Strahlenfolge.

Weil das Geschlecht des Blutspenders die mit dem TPTZ-Test bestimmte Antioxidative Kapazität beeinflusst und etwa ein Drittel der GKB-Patienten weiblich ist, wurde genauer geprüft, ob die aktuelle Geschlechtsverteilung die Signifikanz des Ergebnisses beeinflussen könnte. Das ist der Fall: Während in der unsortierten Gesamtheit der ganzkörperbestrahlten Patienten die schwere Mucositis nach 4 Gy mit $p = 0,038$ mit dem TPTZ-Wert verknüpft ist, verschwindet die Signifikanz für die Messung nach Trennung (Abb.16f oben). Für die Dosis von 8 Gy liegen die entsprechenden Werte bei $p < 0,001$ vor der Aufteilung nach Geschlecht, aber nach der Aufteilung bei $p = 0,012$ für Männer und $0,050$ für Frauen, blieben also schwach signifikant (Abb.16f unten). Die Gruppengröße der GKB-Patienten von $n = 29$ und 9 für schwache bzw. schwere Mucositis nach 4 Gy hat sich durch Aufteilung der Gruppe nach Geschlecht vermindert bei Männern auf $n = 20$ und 5 und bei Frauen auf $n = 9$ und 4 für schwache bzw. schwere Mucositis. Die Aufteilung wirkt sich für die 8 Gy-Gruppengröße noch ungünstiger aus. Das Problem bei diesem Vorgehen verschärft sich noch dadurch, dass mehr Frauen als Männer eine schwere Mucositis bekamen: nach 4 Gy 31% gegenüber 20% und nach 8 Gy 44% gegenüber 26% . Bei den unbestrahlten GKB-Patienten waren es 31% gegenüber 26% . Also müsste beim TPTZ-Test auf Antioxidative Kapazität die Bewertung stets nach Geschlechtern getrennt erfolgen.

Eine Mucositis *als Folge einer Chemotherapie allein* war mit der antioxidativen Kapazität statistisch nicht verknüpft (Abb.16e).

Zusammenfassung:

Die Bestimmung der Leukozytenanzahl und der Verteilung der Lymphozyten-Subtypen erfolgte nur in unbestrahltem Blut und nach Bestrahlung in vivo. Das gleiche gilt für die Antioxidative Kapazität. Alle anderen Parameter wurden sowohl

nach in vitro- als auch in vivo-Bestrahlung gemessen. Diese beiden Bestrahlungen *korrelierten positiv* in ihren Wirkungen bei den jeweiligen Parametern:

- bei den Mikronuclei alle Dosen;
- bei der Apoptose ebenfalls, bei Nekrosen und Zellproliferation aber nicht;
- bei der Zellzyklusphasen-Progression nur 4 Gy, aber nicht 8 Gy;
- bei den Zytokinen für das Interferon und das IL-6 alle Dosen, aber für das IL-8 nicht.

Ob sich aus diesen Befunden ableiten lässt, dass sich in den Fällen einer positiven Korrelation eine Aussage über die individuelle Strahlenempfindlichkeit auf dem Wege der einfacheren in vitro-Testung treffen lässt, muß noch offen bleiben. Denn es fällt auf, wenn man die Tabelle 4 überprüft, dass die Korrelationen nur für diejenigen Parameter positiv waren, für die der strengere nichtparametrische Test nach Kruskal-Wallis eine nicht signifikante Beziehung der in vitro- oder in vivo- Bestrahlung mit der Mucositis anzeigte.

Um eine Übersicht der statistischen Aussagen zu den vielen Einzelergebnissen zu gewinnen, werden die Daten für jeden Parameter gestrafft in einer Tabelle gegeben.

Tabelle 4. Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse des Kruskal-Wallis- Tests für GKB-Patienten. Angegeben sind die bei den einzelnen Labor-Untersuchungen erreichten Signifikanzniveaus für das Auftreten einer schweren Mucositis nach den Dosen von 0, 4 und 8 Gy.

Bestrahlung	<i>in vitro</i> 0 Gy / 4 Gy / 8 Gy	<i>in vivo</i> 0 Gy / 4 Gy / 8 Gy
Leukocyten	--	0.014 / 0.015 / 0.045
CD34+	--	0.041 / 0.030 / 0.013
CD4+	--	n.s.
CD8+	--	n.s.
Micronuclei	n.s.	n.s.
Apoptose	n.s.	n.s. / 0.048 / n.s.
Nekrose	0.016 / 0.008 / 0.031	n.s.
Proliferation	0.033 / n.s. / n.s.	n.s.
Zellzyklus	n.s.	n.s.
Zytokine	n.s.	n.s.
Antioxidative Kapazität	--	alle: n.s. / 0.038 / 0.001 nur Männer: n.s. / n.s. / 0.012 nur Frauen: n.s. / n.s. / 0.050

-- nicht untersucht, n.s. nicht signifikant

Bewertung der Ergebnisse

Für die entscheidende Gruppe, die GKB-Patienten, die in den jeweiligen Messungen maximal 40 Fälle enthält, lässt sich die Power der Statistik abschätzen, der Fehler zweiter Art (Raabe et al. 2000). Für diese Gruppengröße lässt sich ein tatsächlich vorhandener Unterschied nur dann nachweisen, wenn er mehr als 40 % beträgt. Das gilt für die zumeist in medizinischen Studien akzeptierte Power von 80 %. Es ist anzunehmen, dass in den hier untersuchten Parametern die biologischen Unterschiede zwischen strahlenüberempfindlichen und normalen Personen zumeist geringer sind. Um so überraschender ist es, dass sich einige Unterschiede finden lassen, siehe Tabelle 4. Diese Ergebnisse sind statistisch belastbar - bis auf einige Ausnahmen, wie für die Stammzellen, die Proliferation und Apoptose, wo zufällig zustande gekommene positive Ergebnisse zu unterstellen sind. Selbst die für multiple Tests erforderliche Adjustierung nach Bonferroni, die in der Studie, die sich in der Phase der Hypothesenbildung befindet, nicht durchgeführt wurde, würde für die meisten hoch signifikanten statistischen Aussagen wohl keine Änderung bewirkt haben.

7. Voraussichtlicher Nutzen:

Ein direkter finanzieller Nutzen aus diesem Vorhaben ist nicht zu erwarten. Es wird jedoch erwartet, dass die weitere Forschung zur Quantifizierung der Strahlenreaktionen mit in vitro-Methoden von den hier vorgestellten Ergebnissen und den daraus ableitbaren Hypothesen profitiert. Eine weitere klinische Studie sollte untersuchen, ob die hier als auffällig erkannten Labor-Parameter, nämlich eine erhöhte Nekroserate nach in vitro-Bestrahlung, höhere Leukozytenzahlen vor Beginn der Bestrahlung und eine starke Verminderung der Antioxidativen Kapazität nach den ersten verabreichten Fraktionen mit verstärkten Reaktionen des Normalgewebes einhergehen, die u.U. Anlass geben, die vorgesehenen kurativen Dosen zu reduzieren. Als weiterer Nutzen wäre denkbar, dass sich Personen im Blick auf eine geplante berufliche Tätigkeit testen.

Eine Publikation der Ergebnisse in einer internationalen Zeitschrift ist eingereicht.

8. Fortschritt auf diesem Gebiet bei anderen Stellen

Die Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Münster hat inzwischen eine ähnliche Studie zur individuellen Strahlenempfindlichkeit abgeschlossen (Riesenbeck et al. 2004), an der das Institut für Strahlenbiologie mit einigen der zellbiologischen Experimenten beteiligt ist, die auch in dem abgeschlossenen Vorhaben eingesetzt wurden. Diese Studie hat den Vorteil, dass im klinischen Arm wegen der hohen therapeutischen Dosen immer eine (lokale) deutliche Strahlenreaktion auftritt, die in allen klinischen Erscheinungsformen sorgfältig dokumentiert eine eindeutige Identifizierung der strahlenempfindlichen Personen erlaubt. Es ist zu erwarten, dass dabei nach Korrelation der klinischen Befunde mit den Ergebnissen der in vitro-Daten ein aussagekräftiger prä-therapeutischer in vitro-Test erkennbar wird.

Zur strahleninduzierten Mucositis ist eine Arbeit erschienen, die sich mit der Anzahl der neutrophilen Granulozyten in und auf der Mundschleimhaut befasst (Schmidberger et al. 2003). Hier ist die Stärke der Mucositis = Stomatitis tendenziell

mit einer Zunahme der Leukozyten vergesellschaftet und ist als Entzündungszeichen zu werten. Wir fanden jedoch eine höhere Wahrscheinlichkeit für das spätere Auftreten einer Mucositis als Strahlenfolge bei erniedrigten Leukozyten-Ausgangswerten.

Für Mäuse wurde gefunden, dass die Latenzzeit bis zur Ausbildung einer Mucositis 3. Grades und die Dauer der Ulzeration dosis-unabhängig war und auch nicht vom Mäusestamm abhing (Dörr et al., 2002). Das Auftreten der Ulzeration selbst war jedoch dosis-abhängig.

Über die Schwierigkeiten, den Micronuclei-Test zur Prüfung der individuellen Strahlenempfindlichkeit zu nutzen, schrieb Vral et al. 2002 und 2004. Weil die intra-individuelle Variabilität ebenso hoch war wie die zwischen Individuen, empfehlen die Autoren das Verfahren nicht für den vorgesehenen Zweck, halten es jedoch für geeignet, die Strahlenempfindlichkeit von Populationen zu prüfen.

Die Bestimmung der Apoptoserate zur Identifizierung strahlenempfindlicher Personen war Ziel einer Reihe von Studien der letzten Jahre. Während Barber et al. (2000) mit diesem Assay keinen Erfolg hatten, wird die Methode von anderen (Wistop, et al. 2003) propagiert, trotz Schwierigkeiten mit der großen intra-individuellen Variabilität (Kizilian-Martel et al. 2003) und fehlender Übereinstimmung beim Vergleich mehrerer Methoden (Rave-Fränk, et al., 2004).

Eine Übersichtsarbeit über strahlenbiologische Strategien mit Hilfe von Interferonen und Interleukinen (Herskind et al., 2003) beschreibt u.a. die antitumorale Wirkung von Interferon- γ . Es wird in Lymphozyten durch IL-12 induziert und versuchsweise als Medikament verabreicht in Kombination mit einer Strahlen- oder kombinierten Strahlen-Chemotherapie. Wir beobachteten eine klare und dosisabhängige Aktivierung des INF γ durch Bestrahlung in vivo und in vitro, was eine zusätzliche anti-Tumorwirkung bedeutet. Diese Aktivierung von INF γ durch Bestrahlung erwähnt auch Safwat in einem kürzlich erschienenen Kommentar über den Nutzen einer niedrig dosierten GKB (Safwat, 2000).

Die Metaanalyse von Borgmann et al. (2002) gab den Chromosomenanalysen und der PCC (premature chromosome condensation) – Technik an Lymphozyten eine

größere Treffsicherheit für die Vorhersage von Spätschäden an Normalgeweben als den Tests der Koloniebildung und Reparatur von Doppelstrangbrüchen, die an Hautfibroblasten durchgeführt wurden. Dieses Ergebnis gilt nur für die Vorhersage von Spätschäden, aber nicht für frühe Überreaktionen. Lange Zeit war das Gegenteil angenommen worden, nämlich eine zuverlässigere Aussage für Tests an Fibroblasten aber nicht an Lymphocyten. Autoren derselben Arbeitsgruppe berichteten in einer retrospektiven Studie ein Jahr später von einer 2,3 mal höheren jährlichen Fibroserate (also einen Spätschaden) für diejenigen Brustkrebs-Patientinnen, die sich anhand letaler Chromosomen-Aberrationen in bestrahlten Lymphocyten als strahlenempfindlich erwiesen haben (Hoeller, et al., 2003). Die gleichen Aberrationen (dizentrische Chromosomen und azentrische Fragmente) wurden von anderen (Keller, U., et al., 2004) als nicht signifikante Kriterien (wegen der zu großen interindividuellen Variabilität) bezeichnet, um erhöht strahlenempfindliche Personen zu erkennen, im Gegensatz zu anderen Kriterien wie Translokationen und Brüche je Metaphase. Es zeigt sich also, dass auch bei dieser aufwendigen Methode noch keine Einigkeit über ihre Eignung zur Charakterisierung strahlenempfindlicher Personen besteht.

Einen anderen Test beschrieben Perez et al., (2002). Die Autoren beobachteten 72h nach Bestrahlung von Lymphocyten mit 5 Gy einen G2-Phase-Block bei 8,0 % der Zellen von 20 strahlenempfindlichen Tumorpatienten, hingegen bei 2,7 % der Zellen von 10 gesunden Kontrollen.

9. Anhang

Erfolgskontrollbericht

Positiva: Mit diesem Vorhaben wurde nach unserer Kenntnis erstmals die Strahlenreaktion an Lymphocyten nach einer Ganzkörper-Bestrahlung in vivo verglichen mit der nach in vitro-Bestrahlung. Es ist davon auszugehen, dass bei der GKB alle Blutzellen, die im Labortest untersucht worden sind, auch tatsächlich die vorgesehene Ganzkörper-Dosis erhielten. Üblicherweise werden in solchen Untersuchungen bestrahlte Patientenproben auf irgendwelche Parameter getestet und die Ergebnisse mit frühen und/oder späten klinischen Strahlenreaktionen korreliert.

In dieser Studie wurde eine große Palette aufeinander abgestimmter molekular- und zellbiologischer Parameter untersucht. Als Kennzeichen einer erhöhten individuellen Strahlenempfindlichkeit diente die akute Mucositis, eine rasch auftretende Strahlenreaktion, die – das ist die nun aufgestellte Hypothese - durch die drei nach einer Teil- oder Vorbestrahlung zu messenden Blutwerte voraus gesagt werden kann: verminderte Leukozytenzahl und AOK und verstärkte Lymphozyten-Nekrose. Andere, z.T. für die gleiche Fragestellung des öfteren herangezogenen Test-Parameter konnten aus der Gruppe aussichtsreicher Screening-Kandidaten ausgeschlossen werden, wie Stammzellzählung, die Apoptose- und Mikrokern-Bestimmung und die Quantifizierung der Zytokine IL-6, IL-8 und IFN γ . Das kommt auch der Bearbeitung weiterer Forschungsprojekte zugute.

Die Ergebnisse zeigten eine überraschend gute Reproduzierbarkeit, wie sie an den engen Streubreiten für die Messung der Apoptose, der Zyklusphasen-Progression, der Mikronuklei und antioxidativen Kapazitätswerte jedes Einzelprobanden sichtbar werden. Gleichzeitig sind teilweise große Unterschiede zwischen den Probanden erkennbar. Das zeugt von der Zuverlässigkeit bei der Anwendung der eingesetzten Methoden.

Negativa: Es erwies sich am Ende, dass das mit der Strahlenklinik und dem Knochenmark-Transplantationszentrum gemeinsam durchgeführte Vorhaben (siehe Seite 7) für den strahlenbiologischen Teil der Studie den gravierenden Nachteil hatte, dass die Patientenrekrutierung von den Klinikern auf ihre Studienbelange zugeschnitten worden war. Für die Korrelation mit der Mucositis wäre es günstiger gewesen, nur eine Gruppe ganzkörperbestrahlter Patienten zu haben, die einheitlich mit nur einer Gesamtdosis (8 oder 12 Gy) fraktioniert bestrahlt wird. Die statistische Auswertung für eine größere Gruppe wäre zuverlässiger.

Die geplante Anzahl von 60 GKB-Patienten konnte auf Grund der von den Krankenkassen für eine Transplantation begrenzten Patientenzahlen nicht erreicht werden. Der Versuch einer weiteren Patientenrekrutierung über eine Verlängerung der Projektdauer scheiterte. Dasselbe gilt auch für die Gruppe der nur mit Chemotherapie behandelten Leukämiepatienten. Diese Gruppe war von uns bei der Beantragung des Votums der Ethikkommission aufgelistet, wurde dann aber nicht berücksichtigt. Dies wurde von uns zu spät bemerkt. Diese Patienten hätten keinen

Nutzen von dieser Studie gehabt, sie sollten lediglich freiwillig zur Kontrolle eine beträchtliche Menge (45 ml) Blut abgeben. Dazu waren viele nicht bereit, auch die behandelnden Ärzte weigerten sich unter diesen Voraussetzungen, um die freiwillige Zustimmung der Patienten zu werben. Im nachhinein gesehen, ist das Fehlen dieser Gruppe – die 7 freiwilligen Chemopatienten bilden auf Grund der kleinen Zahl statistisch gesehen keine Gruppe – kein gravierender Nachteil, weil die entscheidende Kontrolle die GKB-Patienten selbst darstellen: ihr Blut vor der Bestrahlung abgenommen ist die interne, best-vorstellbare Kontrolle.

Einhalten des Kosten- und Zeitplans

Im Rahmen der vorgesehenen Therapieprotokolle in der laufenden klinischen Studie (siehe Probandengruppe 2) sollten jährlich etwa 20 ganzkörperbestrahlte Patienten untersucht werden. Im 1. Projektjahr kamen 40 gesunde freiwillige Blutspender als Vergleichsgruppe hinzu. Im 2. Jahr sollten zu den 20 GKB-Patienten noch 20 gesunde Freiwillige rekrutiert werden, deren Blut nur in vitro bestrahlt wurde. Zusätzlich sollten 20 Chemotherapie-Patienten einbezogen werden, deren Anzahl im 3. Jahr auf insgesamt 60 Chemotherapiepatienten aufgestockt werden sollten. Dazu sollten die 20 letzten GKB-Patienten aufgenommen werden.

Diese Planung ließ sich auf Grund der oben genannten Bedingungen nicht verwirklichen. Nur die Anzahl der Normalprobanden wurde mit 67 statt 60 Personen überschritten.

Die veranschlagten Kosten für das Vorhaben sind nicht verbraucht worden. Das hatte mehrere Gründe: Sie wurden zu einem Teil vom Institut getragen, das Gehalt der Wissenschaftlerin, Frau Dr. E. Pascher, war auf Grund ihrer Familiensituation geringer als zuvor angesetzt, es kam zu Einsparungen auf Grund ihres späten Dienstantritts und schließlich wurden die Reisekosten in einem nur geringen Umfang in Anspruch genommen oder auch vom BfS abgelehnt, als ein nicht aus dem Projekt finanzierter Kollege, Herr Dr. B. Greve, den Kongress-Vortrag gehalten hatte.

10. Bisherige Publikationen

Greve, B., Pascher, E., Beller, C., Göhde, W.: Volumetric counting of lymphocyte subclasses in peripheral blood of whole body irradiated patients.

5. Kongress für Flow-Zytometrie und Bildanalyse, Graz (Österreich) 2001.

Pascher, E., Wedemeyer, N., Greve, B., Severin, E., Göhde, W.: Establishing flow cytometric techniques for determination of individual radiosensitivity.

21. ISAC Meeting, San Diego, USA, 4.-9.5.2002 ,

Publiziert als Abstract in: Cytometry, Suppl. 11: 120-121 (2002)

Pascher, E., Wedemeyer, N., van Dülmen, A., Göhde, W.: Flow cytometric analyses in human lymphocytes after X-irradiation.

6. Wolfsberg-Meeting 2002, Ermatingen, Schweiz, 8.-10.6.2002

Severin, E., Pascher, E., Greve, B., Wedemeyer, N., Hacker-Klom, U., Kienast, J., Willich, N., Göhde, W.: Evidence for predictive validity of blood assays to evaluate individual radiosensitivity. Strahlentherapie und Onkologie, 2004 (eingereicht)

11. Zitierte Literatur:

Barber, J.B.P., West, C.M.L., Kiltie, A.E., Roberts, S.A., Scott, D.: Detection of individual differences in radiation-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes in normal individuals, ataxia telangiectasia homozygotes and heterozygotes, and breast cancer patients after radiotherapy. Radiat. Res. 153: 570-578 (2000)

Bartelink, H., Begg, A., Martin, J.C., van Dijk, M., van 't Veer, L., van der Vaart, P., Verheji, M.: Towards prediction and modulation of treatment response. Radiotherapy & Oncology 50: 1-11 (1999).

Bentzen, M.S.: Potential clinical impact of normal-tissue intrinsic radiosensitivity testing. Radiotherapy & Oncology 43: 121-131 (1997).

Benzie, I.F.F., Strain, J.J.: Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology, 299, 15-27 (1999).

Borgmann, K., Röper, B., Abd El-Awady, R., Brackrock, S., Bigalke, M., Dörk, T., Alberti, W., Dikomey, E., Dahm-Daphi, J.: Indicators of late normal tissue response

after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. *Radiotherapy & Oncology* 64: 141-152 (2002).

Budach, W., Claßen, J., Belka, C., Bamberg, M.: Clinical impact of predictive assays for acute and late radiation morbidity. *Radiotherapy & Oncology* 174: 20-24 (1998).

Cassenss, U., Greve, B., Tapernon, K., Nave, B., Severin, E., Sibrowski, W., Göhde W.: A novel true volumetric method for the determination of residual leucocytes in blood components. *Vox Sanguinis* 82: 198 – 206 (2002)

Coco Martin, J.M., Mooren, E.; Ottenheim, C.; Burrill, W.; Nunez, M.I.; Sprong, D.; Bartelink, Begg, A.C.: Potential of radiation-induced chromosome aberrations to predict radiosensitivity in human tumour cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 75: 1161-1168, (1999).

Dikomey, E., Borgmann, K., Peacock, J., Jung, H.: Why recent studies relating normal tissue response to individual radiosensitivity might have failed and how new studies should be performed. *Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys.* 56: 1194-1200, (2003).

Fertil, B.; Deschavanne, P.J.: Relationships between colony and parameters of intrinsic radiosensitivity. *Radiation Biology* 75: 1275-1282 (1999).

Frankenberg, D., Kelnhofer, K., Bär, K., Frankenberg-Schwager, M.: Enhanced neoplastic transformation by mammography X rays relative to 200 kVp X rays: Indication for a strong dependence on photon energy of the RBE_M for various end points. *Radiation Research* 157: 99-105 (2002)

Göhde, W., Uthe, D., Wedemeyer, N., Severin, E., Greif, K., Schlegel, D., Brede, H.J., Köhnlein, W.: Mutagenic effect of low energy neutrons on human chromosome 11. *Int. J. Radiation Biology* 79 : 911-918 (2003)

Herskind, C., Fleckenstein, K., Lohr, J., Li, C.-Y., Wenz, F., Lohr, F.: Antitumorale Wirkung von Interferonen und Interleukinen in Kombination mit Strahlentherapie.. Teil II: Strahlenbiologische und immunologische Strategien. *Strahlenther. Onkol.* 180: 331- 339 (2004).

Hoeller, U., Borgmann, K., Bonacker, M., Kuhlmeier, A., Bajrovic, A., Jung, H., Alberti, W., Dikomey, E.: Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. *Radiother. Oncol.* 69: 137-144 (2003)

Hoffman, R.M.: In vitro sensitivity assays in cancer: A review, analysis, and prognosis. *Clinical laboratory analysis* 5: 133-143 (1991).

- Keller, U., Kuechler, A., Liehr, T., Müller, E., Grabenbauer, G., Sauer, R., Distel, L.: Impact of various parameters in detecting chromosomal aberrations by FISH to describe radiosensitivity. *Strahlenther. Onkol.* 180: 289-296 (2004).
- Kizilian-Martel, N., Wilkins, R.C., Mclean, J.R., Malone, S. Raaphorst, G.P.: Prediction of radiosensitivity by measurement of X-ray induced apoptosis in human blood using the comet assay. *Anticancer Res.* 23(5A): 3847-3854 (2003)
- Oppitz, U.; Baier, K.; Wulf, J.; Schakowski, R.; Flentje, M.: The in vitro colony assay: a predictor of clinical outcome. *Int.J.Radiation Biology* 77, 105-110, (2001).
- Perez, A., Distel, L., Sieber, R., Müller, E., Grabenbauer, G.G., <Sauer, R.: Können erhöht strahlenempfindliche Patienten anhand der Zell-Zyklus-regulation ihrer T-Lymphozyten identifiziert werden? *Strahlenther. Onkol.* 178 (Sondernr.1):86 (2002)
- Raabe, A., Dubben, H.-H., Beck-Bornholdt, H.-P.: Der Fehler zweiter Art und seine Bedeutung bei der Beurteilung von Resultaten. *Strahlenther. Onkol.* 176:1-7 (2000).
- Rave-Fränk, M., Lücke, E., Pradier, O., Schmidberger, H.: Quantitative Bestimmung strahleninduzierter Apoptose an Zellen aus soliden Tumoren: ein Methodenvergleich. *Strahlenther. Onkol.* 180 (Sondernr.1): 63 (2004)
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237 (1999).
- Rice-Evans, C., Miller, N.J.: Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*, 234, 279-293 (1994).
- Safwat, A.: The immunobiology of low-dose total-body irradiation: more questions than answers. *Radiat.Res.* 153: 599-604 (2000).
- Schmidberger, H., Rave-Fränk, M., Kim, S., Hille, A., Pradier, O., Hess, C.F.: Strahleninduzierte Mukositis und neutrophile Granulozyten in der Mundschleimhaut. *Strahlenther. Onkol.* 179: 667-672 (2003).
- Stauböl-Grön, B., Overgaard, J.: Relationship between tumour cell in vitro radiosensitivity and clinical outcome after curative radiotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother.Oncol.* 0: 47-55 (1998)
- Vral, A., Thierens, H., Baeyens, A., De Ridder, L.: The micronucleus and G₂-phase assays for human blood lymphocytes as biomarkers of individual sensitivity to ionizing radiation: limitations imposed by intraindividual variability. *Radiat.Res.* 157: 472-477 (2002).

Vral, A., Thierens, H., Baeyens, A., De Ridder, L.: Chromosomal aberrations and in vitro radiosensitivity : intra-individual versus inter-individual variability. Toxicol. Lett. 149: 345-352 (2004).

UNSCEAR: Sources and effects of ionizing radiation, United Nations, New York (1993)

West, C.M.L.; Davidson, S.E.; Elyan, S.A.G.; Swindell, R.; Roberts, S.A.; Orton, C.J.; Coyle, C.A.; Valentine, H.; Wilks, D.P.; Hunter, R.D.; Hendry, J.H.: The intrinsic radiosensitivity of normal and tumour cells. Radiation Biology 73, 409-413 (1998).

Wedemeyer, N., Pötter, T., Wetzlich, S., Göhde, W.; Flow Cytometric quantification of competitive reverse transcription-PCR products. Clinical Chemistry 48, 1398-1405 (2002).

Wistop, A., Distel, L., Sieber, R., Grabenbauer, G.G., Sauer, R.: Weisen Patienten mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit erniedrigte lymphozytäre Apoptoseraten auf? Strahlenther. Onkol. 178 (Sondernr.1):85 (2002)

Wollin, M.; Kagan, A.R.; Norman, A.: Predicting normal tissue injury in radiation therapy. Radiation Oncology 21, 1373-1376 (1991).

Zimmermann, J.S.; Kumpf, L. Kimmig, B.: Variability of individual normal tissue radiation sensitivity. Radiotherapy & Oncology 174, 16-19 (1998).

Abbildungen

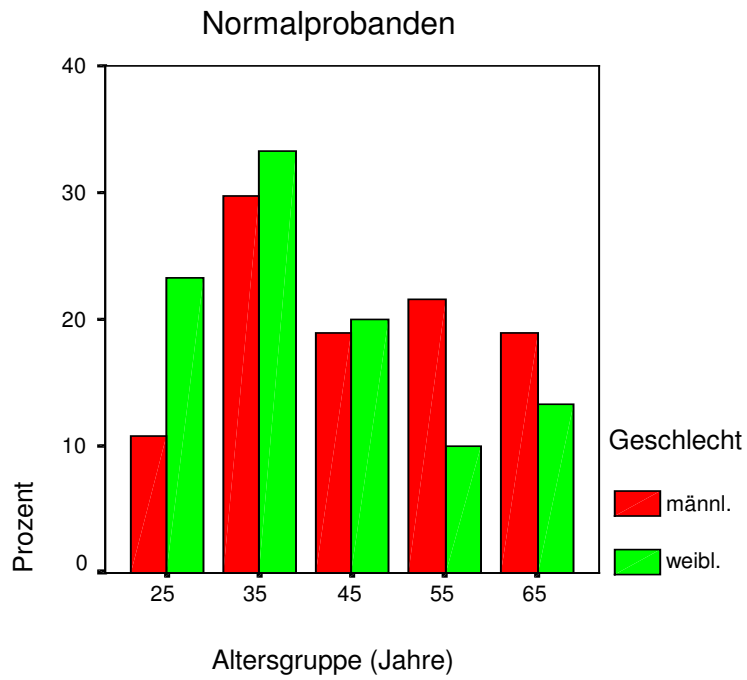


Abbildung 1a

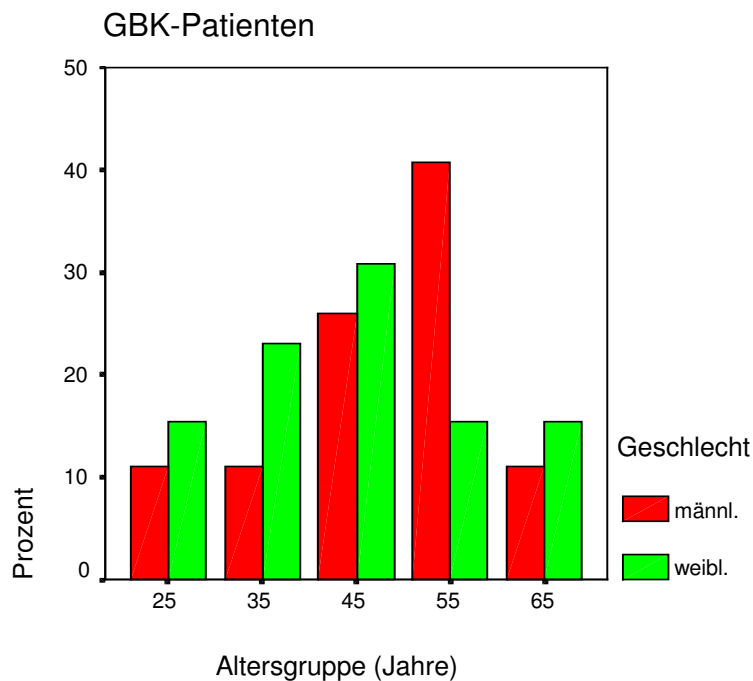


Abbildung 1b

Abbildung 1: Alters- und Geschlechtsverteilung der gesunden Blutspender (1a) im Vergleich zu den GKB-Patienten (1b).

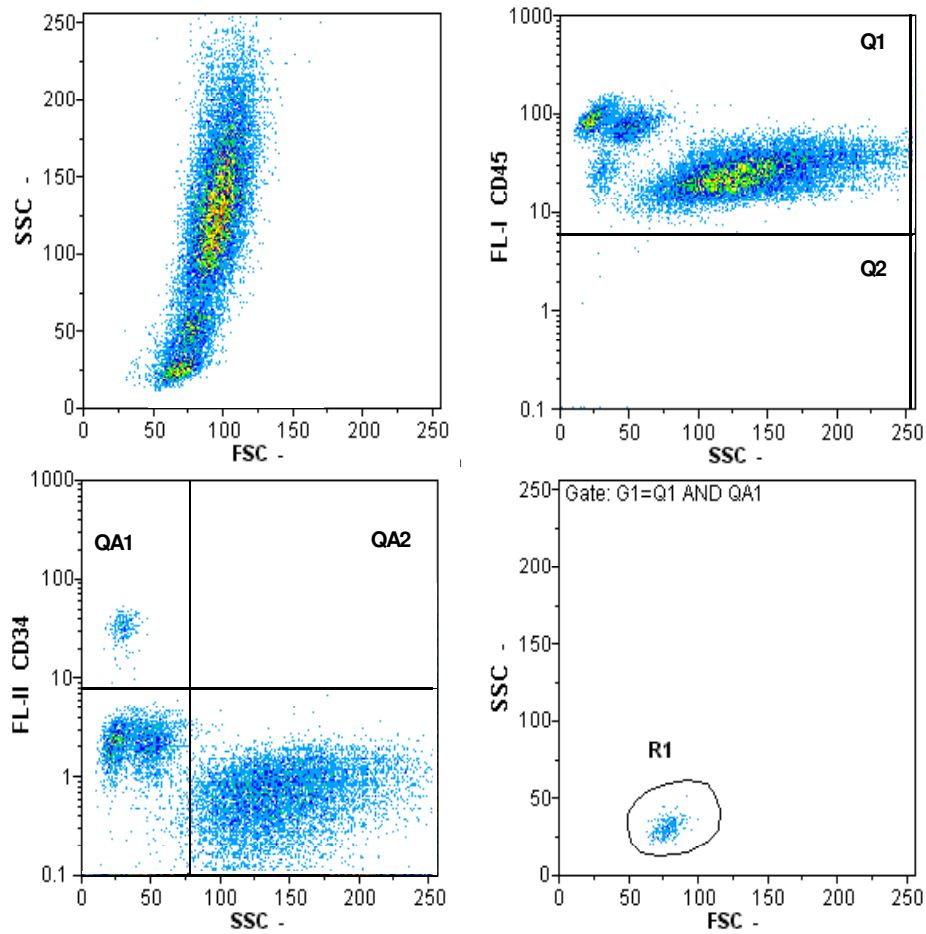


Abbildung 2 Beispiel für eine Zählung von Stammzellen nach Markierung von Zellen im Vollblut mit CD45-Antikörpern (= alle Leukozyten rechts oben in Q1) und zusätzlich CD34-Antikörpern (= Blutstammzellen) links unten im Feld QA1. Die richtige Erfassung dieser Zellen wird im Feld rechts unten (Fenster R1) überprüft. Im Feld links oben sind alle Partikel in der Flüssigkeit erfasst worden.

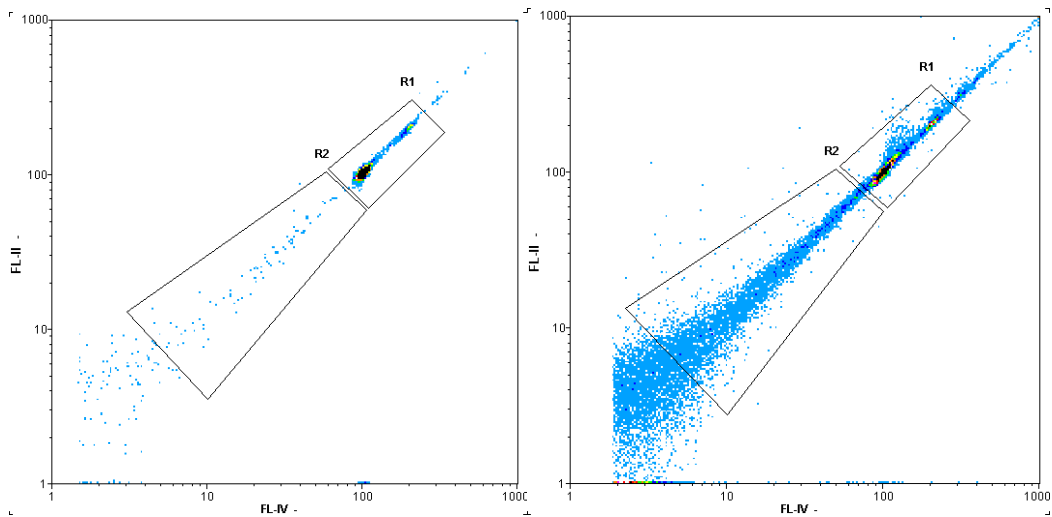


Abbildung 3 Beispiel für eine Messung und Zählung von Mikronuklei innerhalb des Fensters R2 vor (links) und nach (rechts) in vitro-Bestrahlung. Das Fenster ist so gelegt worden, dass es alle Zählereignisse zwischen 10 und 90 % des diploiden DNA-Wertes eines Lymphozyten erfasst.

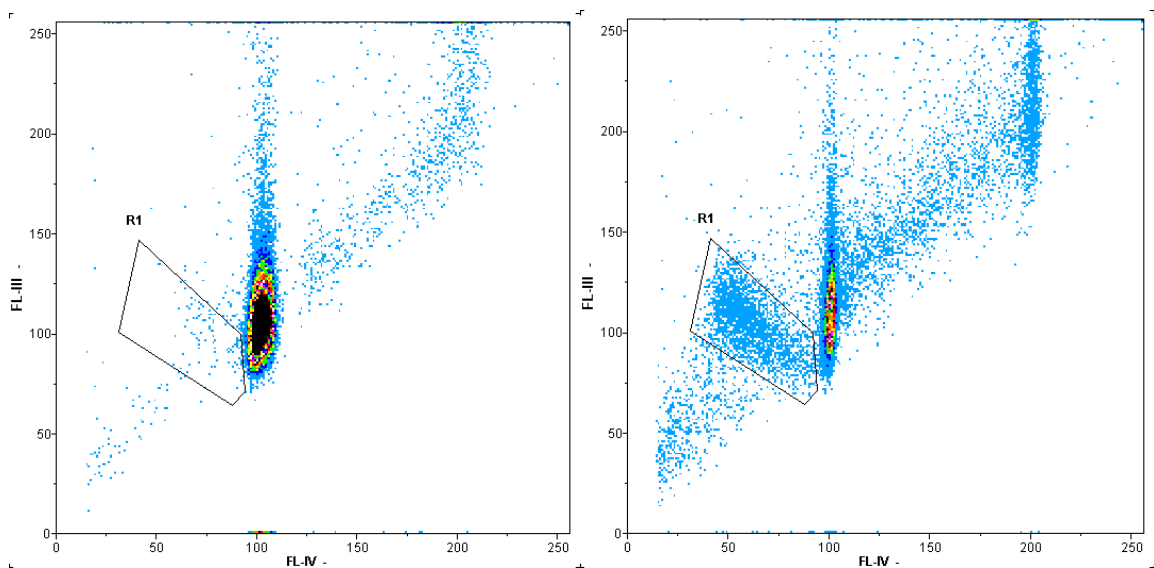


Abbildung 4 Beispiel für die Bestimmung von Apoptose, Nekrose und Zellproliferation mit einer einzigen Messung. Linkes Bild vor, rechtes Bild nach in vitro-Bestrahlung. Protein: Ordinate, DNA: Abszisse. Die Zellen im Fenster R1 machen Apoptose (= gleichbleibender Protein-Wert), die Zellen links unten erleiden Nekrose. Ein Index für die Proliferation wurde abgeschätzt durch Zählung aller Messereignisse oberhalb von Kanal 100 geteilt durch alle intakten Zellen.

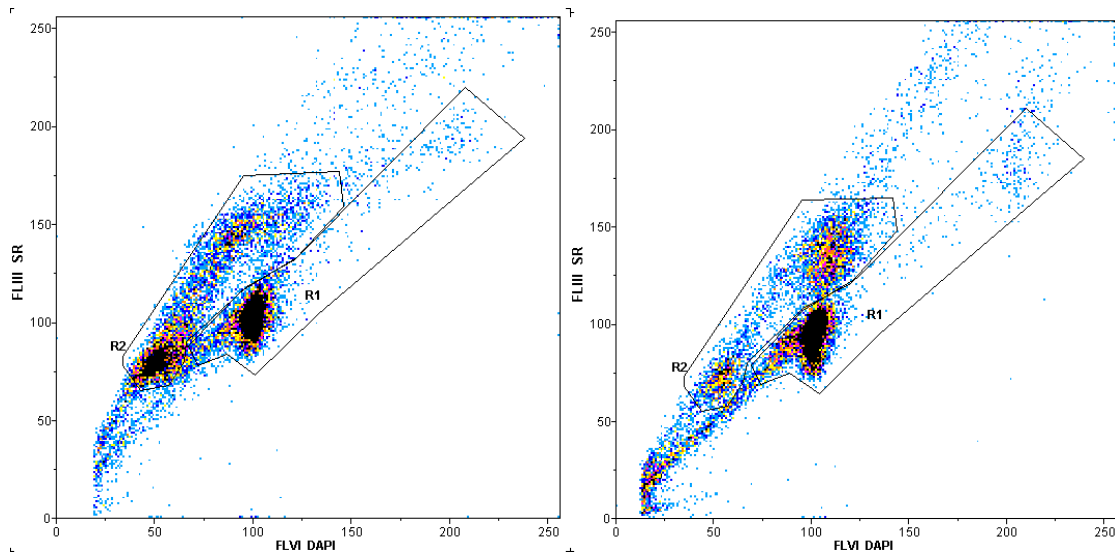
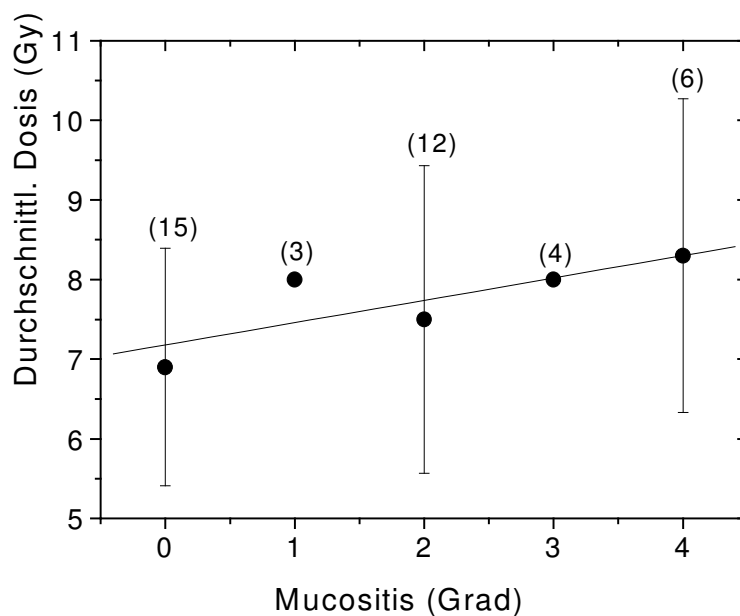


Abbildung 5 Beispiel für eine Bestimmung der Progression der Zellzyklusphasen mit BrdU-Quenching (linkes Bild vor, rechtes Bild nach in-vitro-Bestrahlung). Die Zellen im Fenster R1 befinden sich noch im ursprünglichen Zyklus, während diejenigen im Fenster R2 sich bereits geteilt haben und sich z.T. schon in der S-, G2-, und M-Phase des neuen Zellzyklus befinden.

Abbildung 6a:



Grad der Mucositis in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Die mittlere Ganzkörperdosis (Ordinate) wurde berechnet als Summe aller Dosen, die Personen mit einem bestimmten Grad der Mucositis erhalten hatten, dividiert durch die Anzahl der Personen in dieser Gruppe (angegeben in Klammern). Standardabweichung, Länge des Balkens. Die Korrelationsgerade lässt eine dosisabhängige Ausprägung der Mucositis erkennen.

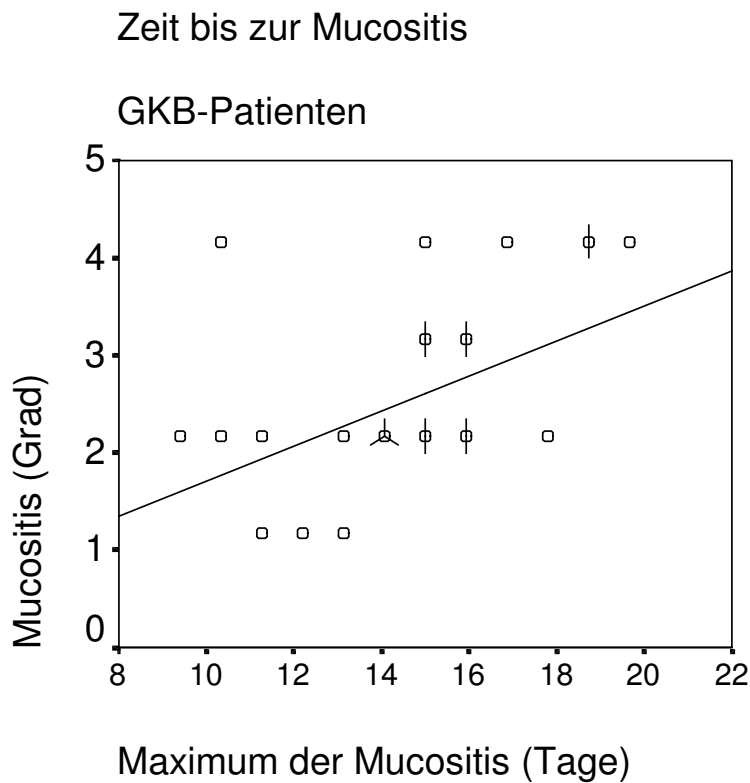


Abbildung 6b: Beziehung zwischen dem Schweregrad der Mucositis und dem Zeitpunkt ihrer maximalen Ausprägung. Ganzkörper-bestrahlte Patienten. Die Anzahl der Striche an einigen der Punkte bedeutet Anzahl gleicher Werte. Die Korrelationsgerade lässt eine zeitabhängige Ausprägung der Mucositis erkennen.

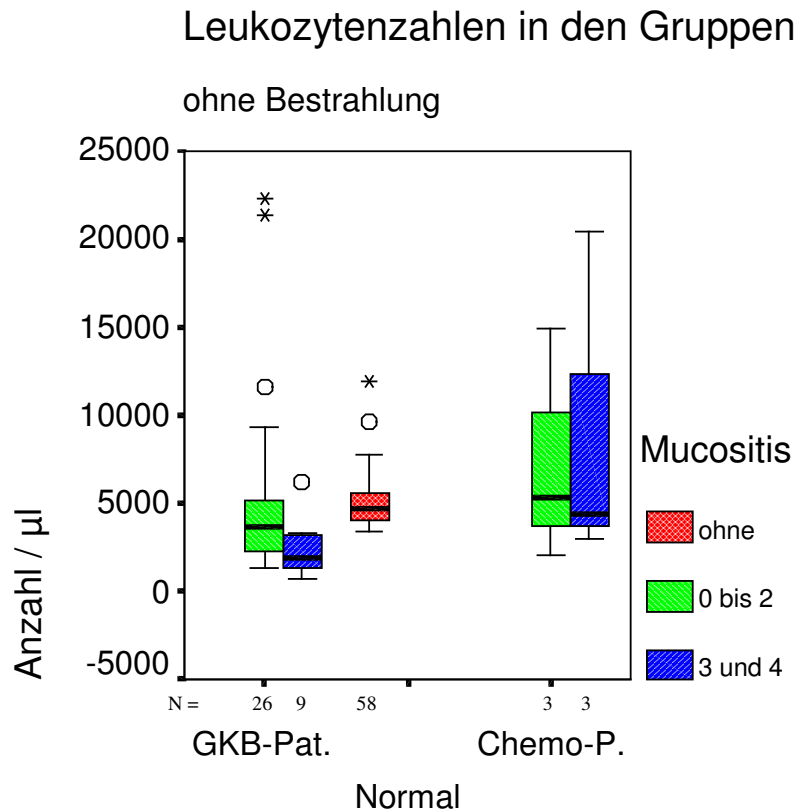
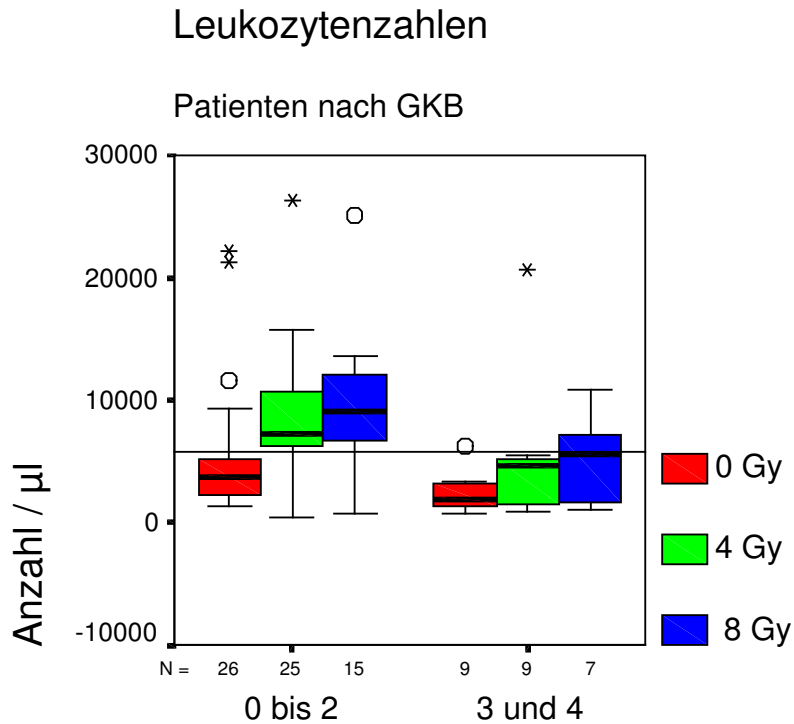


Abbildung 7a Vergleich der Leukozytenzahlen in den Gruppen und Bezug auf den Schweregrad der Mucositis – ohne bzw. leicht (= 0 bis 2) vs. schwer (= 3 und 4). Boxplot-Darstellung. Die allein chemotherapeutisch behandelten Patienten weisen die höchsten Abweichungen auf. Die farbigen Boxen umfassen jeweils 50% der Werte, d.h. das 25- bis 75-Perzentil, der schwarze Querbalken ist der Medianwert. Die Arme geben den Minimal- und Maximalwert an, jedoch höchstens das 1,5fache der Kastenlänge, Kreise sind darüber hinausgehende Extremwerte, Sterne sind Ausreißer.



Mucositis

Abbildung 7b Boxplot-Darstellung des Zusammenhangs der Leukozytenzahlen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis in vivo und dem Schweregrad der Mucositis für GKB-Patienten. Die Trennlinie liegt bei 6200. Veranschaulicht sind die signifikanten Unterschiede für die Dosen von 4 und 8 Gy (p 0,015 und 0,045).

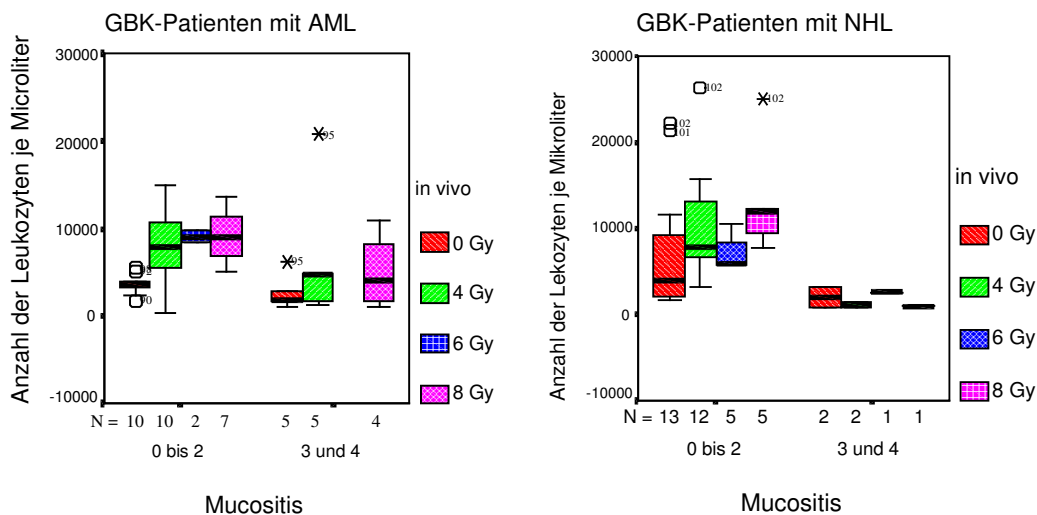


Abbildung 7c und d Aufteilung der GKB-Patienten in die beiden größten Krankheitsgruppen: AML und NHL. Es zeigt sich, dass nun die signifikanten Unterschiede zwischen den Mucositis-Schweregraden verschwunden sind (bis auf 4 Gy in der NHL-Gruppe).

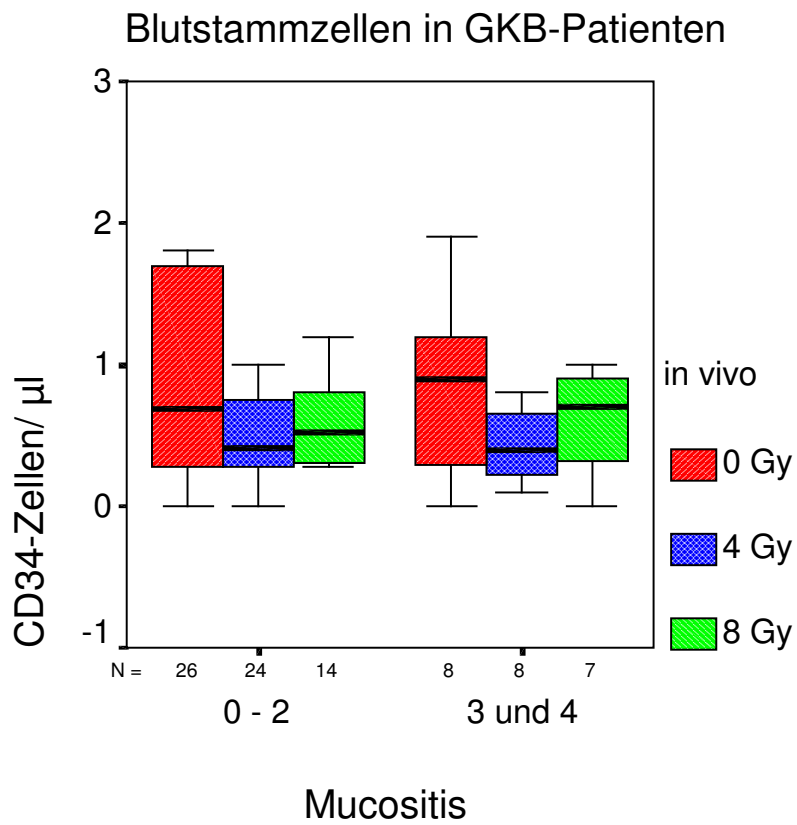
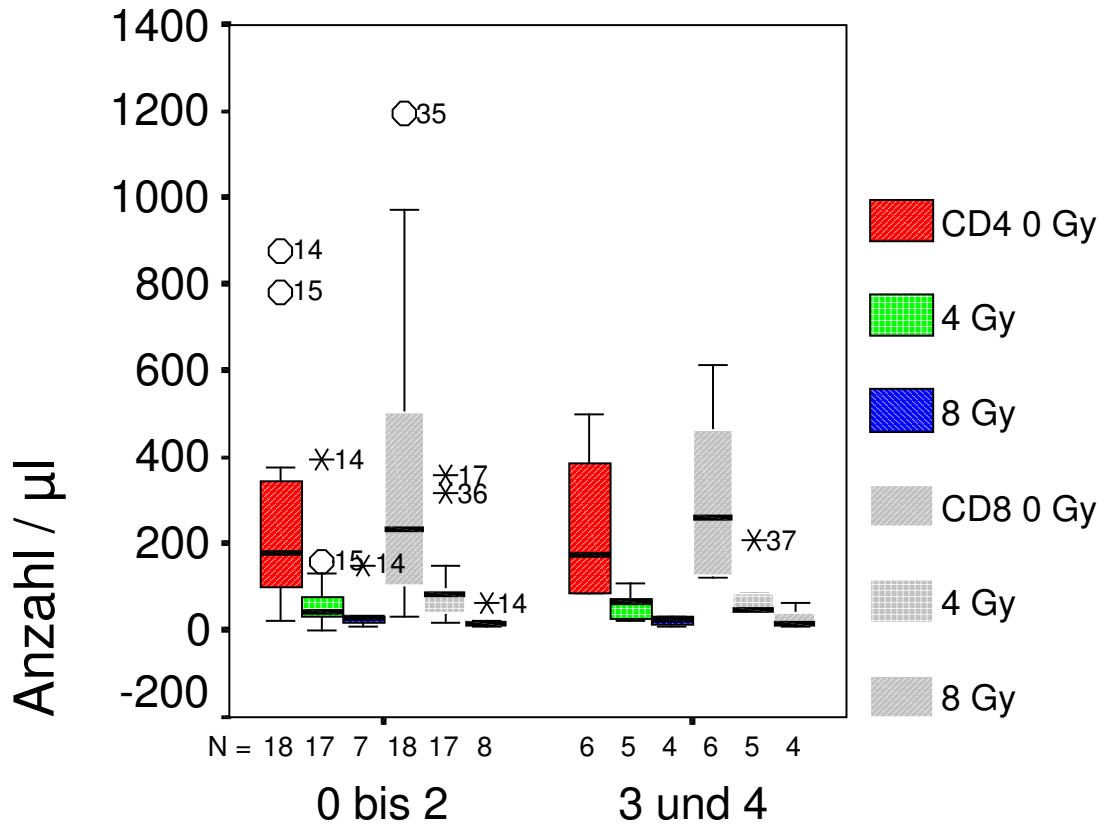


Abbildung 8 Anzahl der CD-34-positiven Stammzellen / μ l im Blut von GKB-Patienten, aufgeteilt nach Grad der Mucositis.

CD4- und CD8-Lymphozyten

GBK-Patienten



Mucositis

Abbildung 9a Boxplot-Darstellung der Verteilung von CD4- und CD8- Lymphozyten auf die Mucositis-Schweregrade nach in vivo-Bestrahlung von GKB-Patienten. Auffallend ist die in allen Gruppen gleichförmige Verminderung der Zellzahl mit steigender Dosis.

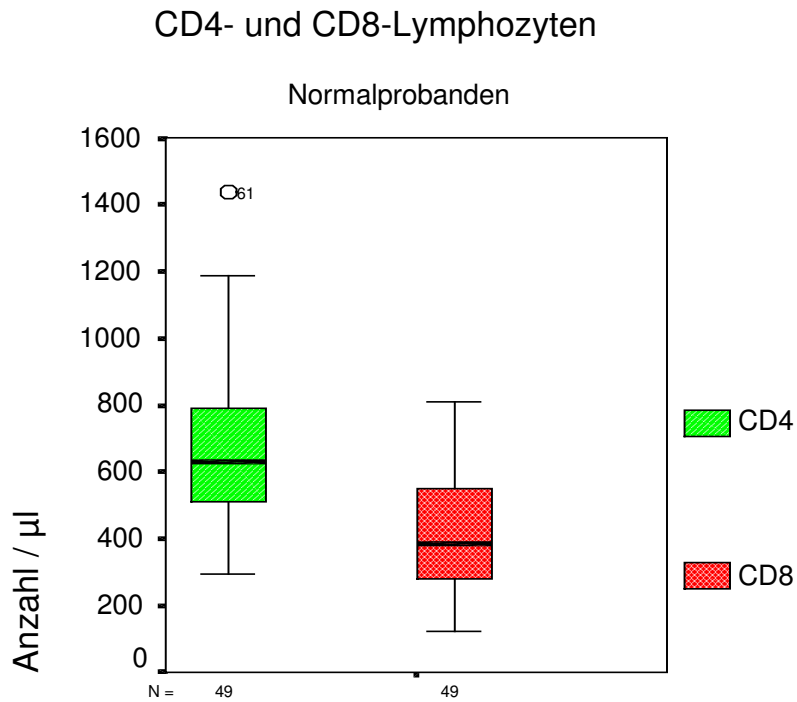


Abbildung 9b Boxplot-Darstellung der Verteilung von CD4- und CD8- Lymphozyten von unbestrahlten Normalprobanden.

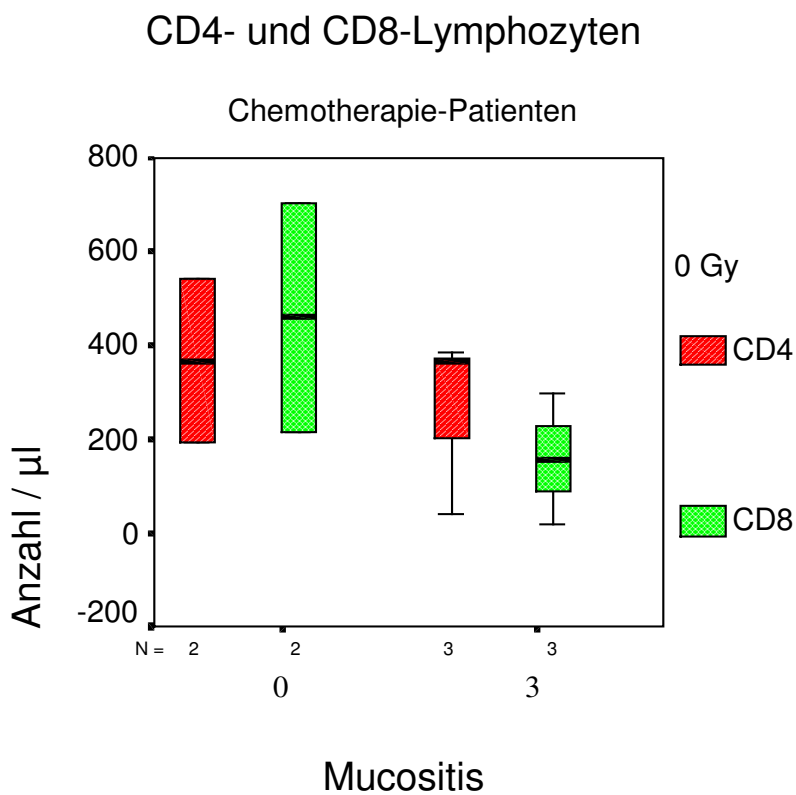


Abbildung 9c Boxplot-Darstellung der Verteilung von CD4- und CD8- Lymphozyten auf die Mucositis-Schweregrade von unbestrahlten Chemotherapie-Patienten.

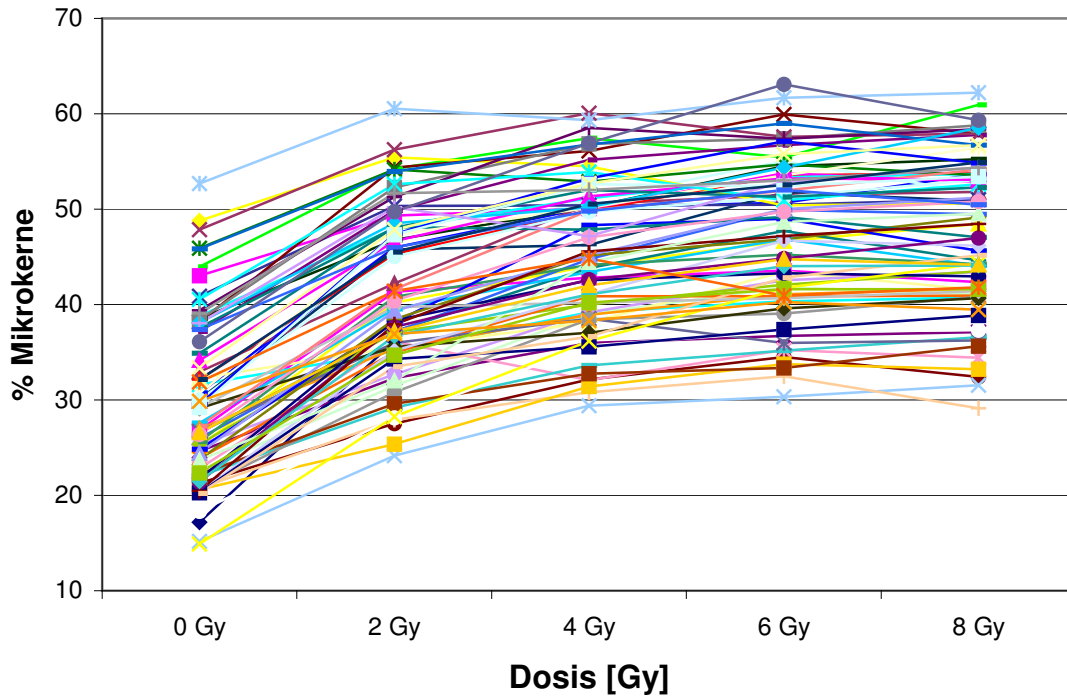
Mikrokerne bei in vitro bestrahlten Normalprobanden

Abbildung 10a Dosiswirkungskurven für Mikrokerne nach alleiniger DNA-Färbung unter Kultivierung vor (0 Gy) und nach in vitro- Bestrahlung mit 2 bis 8 Gy für Normalprobanden. Sichtbar werden die nahezu parallel verlaufenden Linien für die einzelnen Personen.

Mikrokerne nach in vitro-Bestrahlung von GKB-Patienten

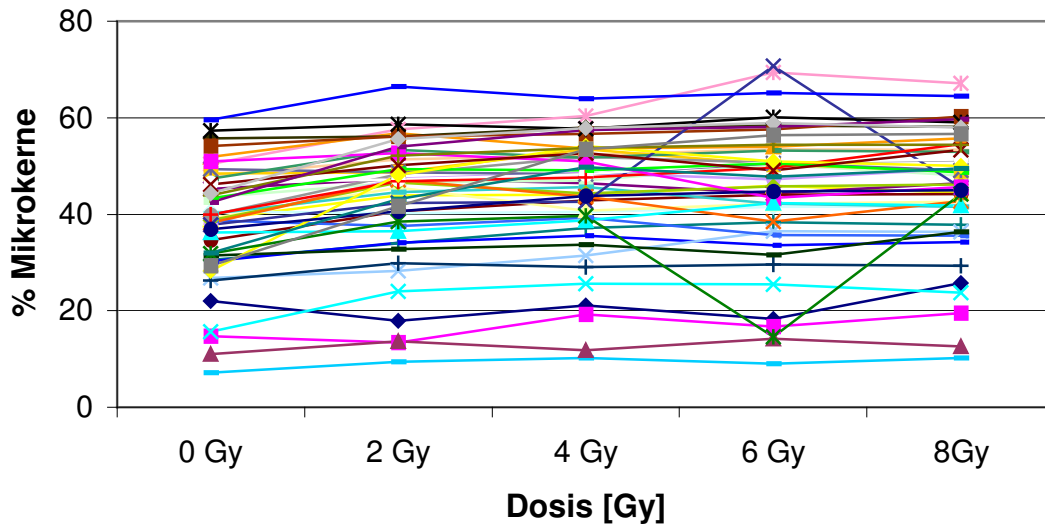


Abbildung 10b Dosiswirkungskurven für Mikrokerne nach alleiniger DNA-Färbung unter Kultivierung vor (0 Gy) und nach in vitro- Bestrahlung mit 2 bis 8 Gy für Patienten. Sichtbar werden die nahezu parallel verlaufenden Linien für die einzelnen Personen.

Mikrokerne bei GKB - Patienten

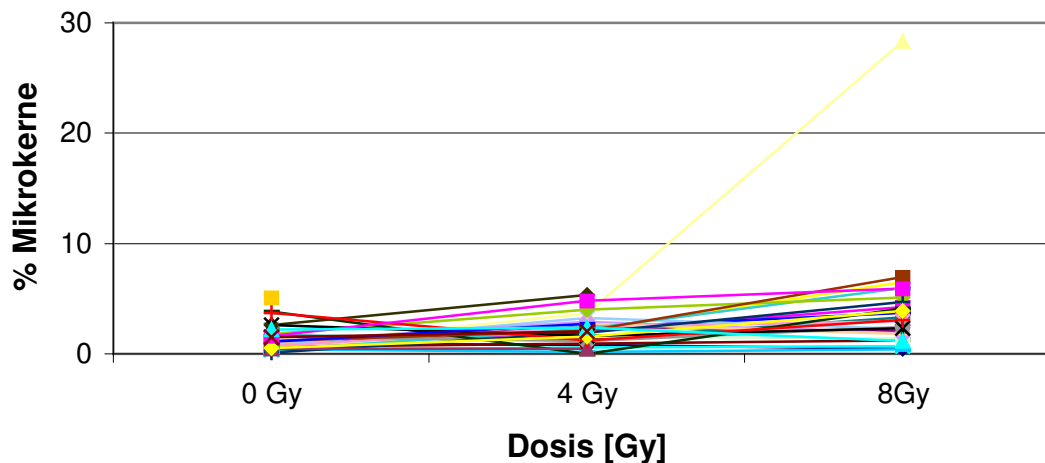


Abbildung 10c Dosiswirkungskurven für Mikrokerne nach alleiniger DNA-Färbung ohne Kultivierung vor (0 Gy) und nach in vivo- Bestrahlung mit 4 und 8 Gy.

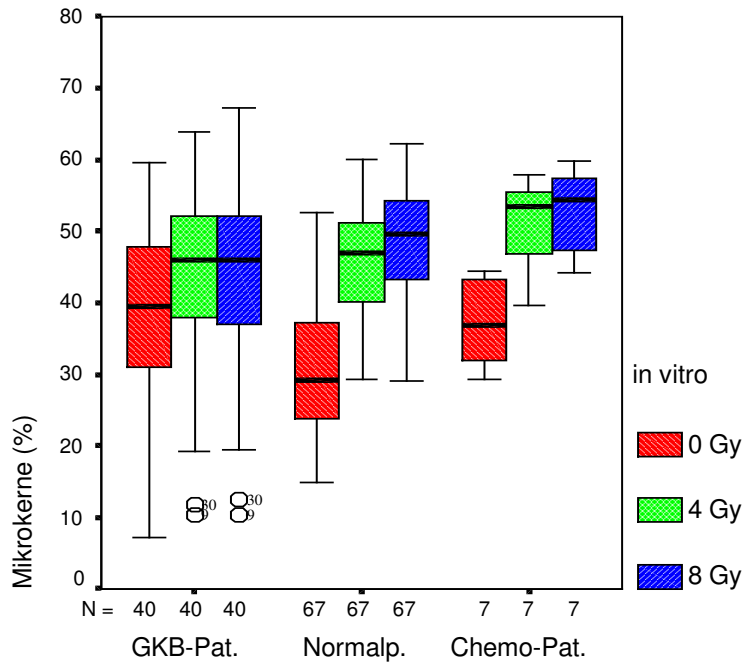


Abbildung 10d Verteilung der Mikrokerne in den Gruppen nach in vitro-Bestrahlung und 72stündiger Inkubation. Deutlich werden die zu hohen Schädigungsraten.

Apoptose bei GKB-Patienten nach in vitro-Bestrahlung

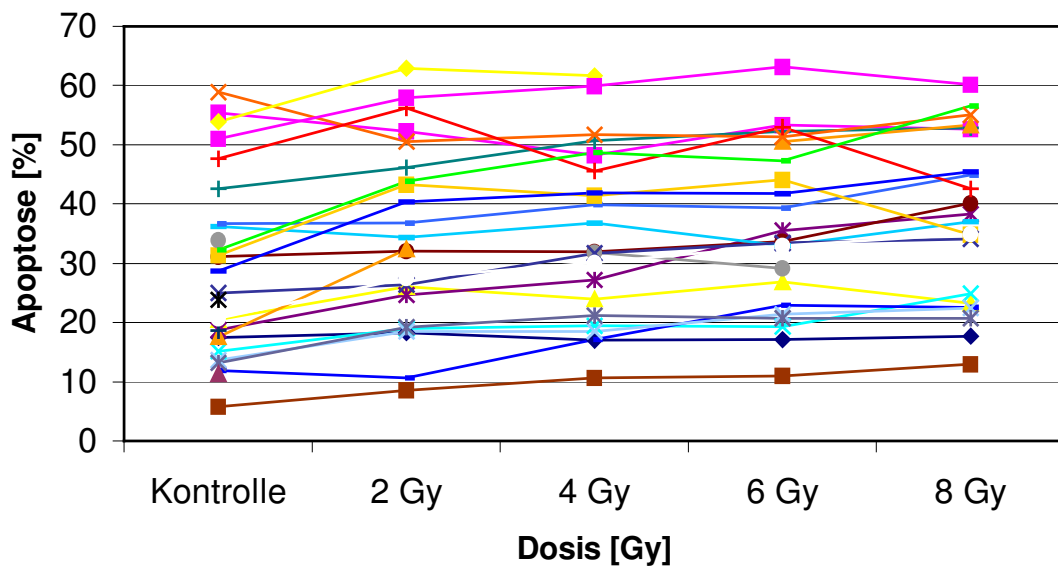


Abbildung 11a Dosis-Wirkungskurven für Apoptose bei in vitro bestrahlten GKB-Patienten. Die gleichmäßigen Kurvenverläufe je Patient sind ein Zeichen für gute Messungen, liegen aber viel zu hoch als Zeichen einer falschen Kultivierung.

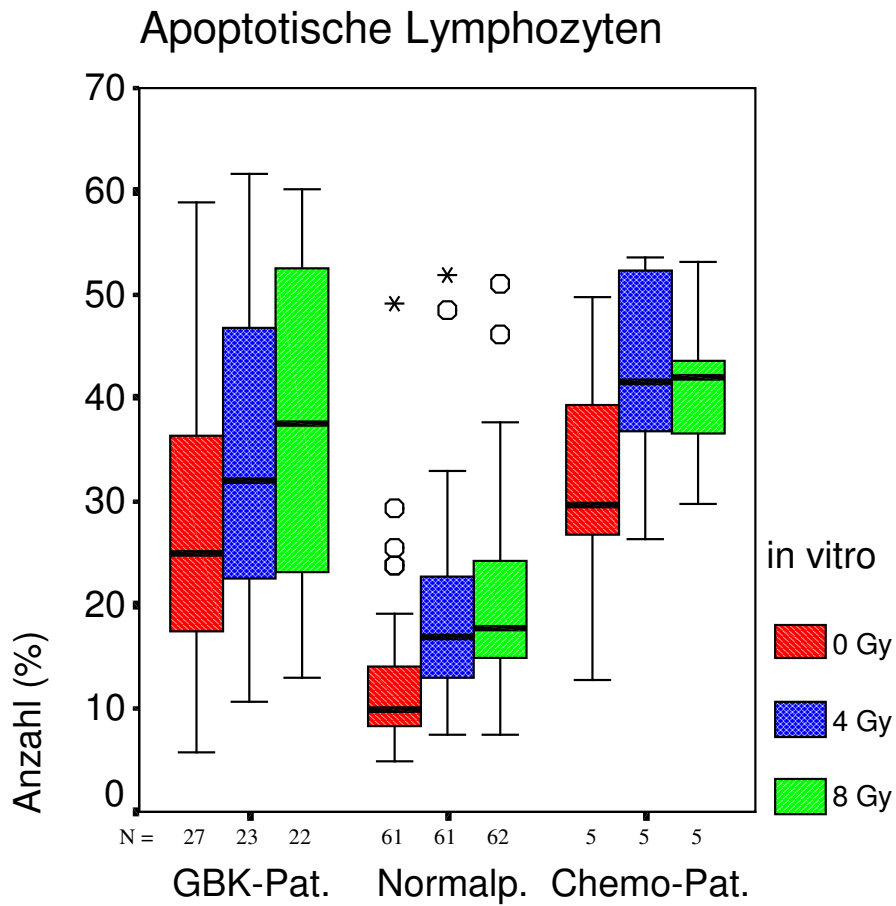


Abbildung 11b Verteilung der Apoptosen in den Gruppen nach in vitro-Bestrahlung und 72stündiger Inkubation. Deutlich werden die zu hohen Schädigungsraten (ähnlich wie bei den Mikrokernen).

Apoptotische Lymphozyten
bei Patienten nach GBK

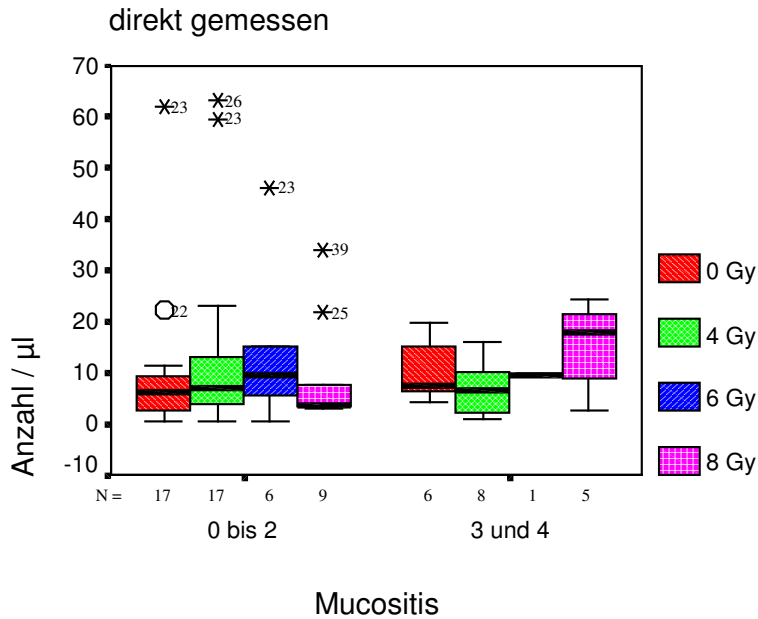


Abbildung 11c Verteilung der apoptotischen Lymphozyten auf die Mucositis-Schweregrade nach in vivo-Bestrahlung von GKB-Patienten. Ohne 72stündige Inkubation, sondern direkt gemessen mit nun erwartungs-gemäßen Schädigungs-raten.

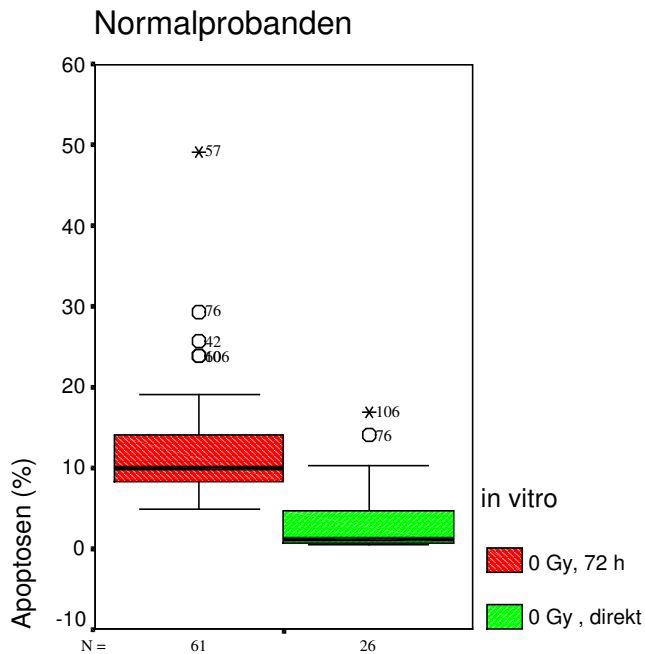


Abbildung 11d Verteilung der apoptotischen Lymphozyten ohne Bestrahlung von Normalprobanden. Vergleich der Messungen nach 72stündiger Inkubation und Direktmessung.

Nekrotische Lymphozyten bei in vitro bestrahlten Normalprobanden

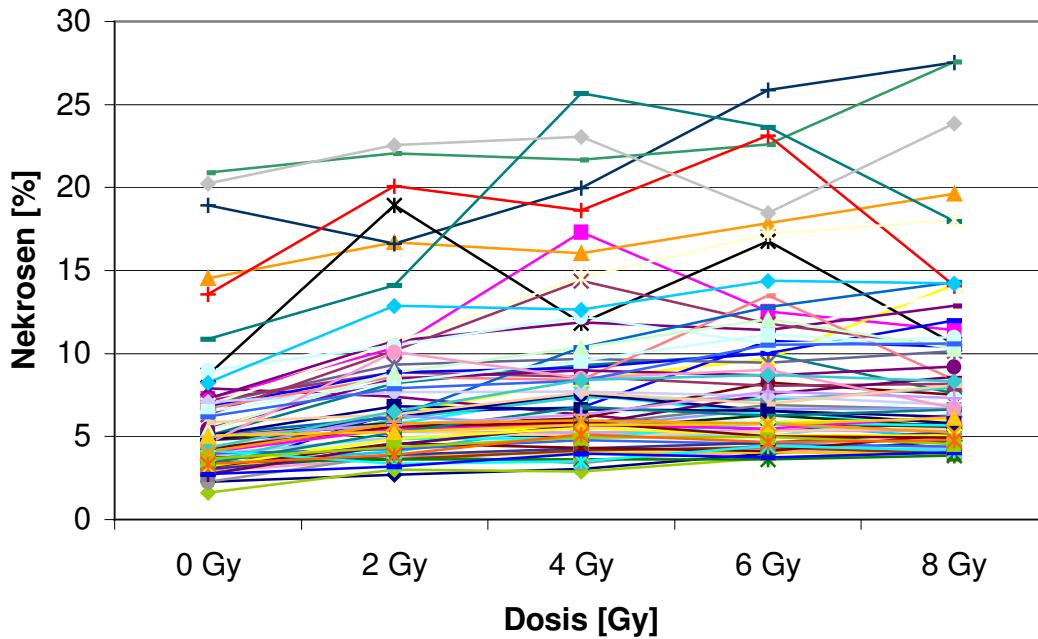


Abbildung 12a Dosis-Wirkungskurven für Nekrosen bei in vitro bestrahlten Lymphozyten von Normalprobanden

Nekrotische Lymphozyten in GKB-Patienten nach in vitro-Bestrahlung

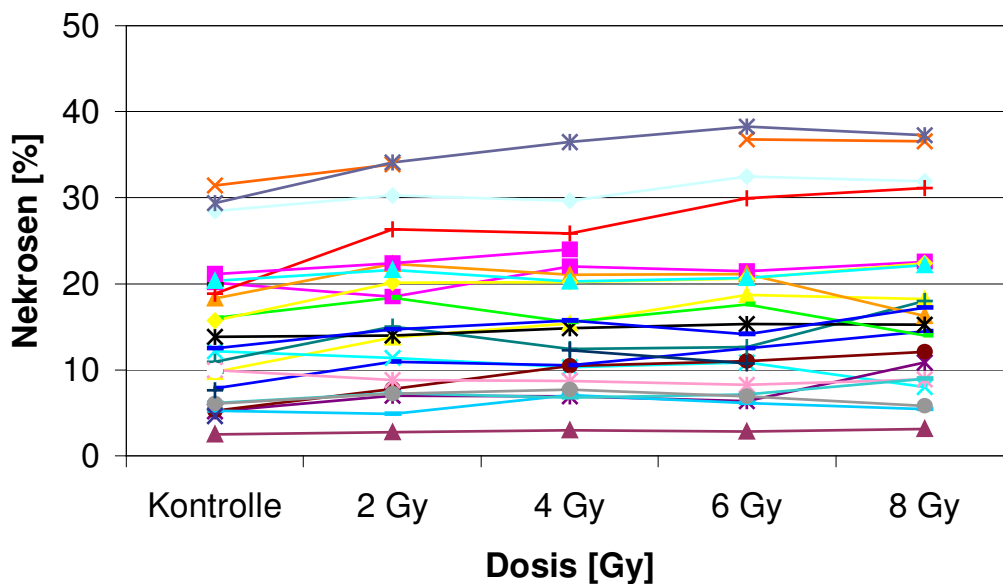


Abbildung 12b Dosis-Wirkungskurven für Nekrosen bei in vitro bestrahlten Lymphozyten von GKB-Patienten

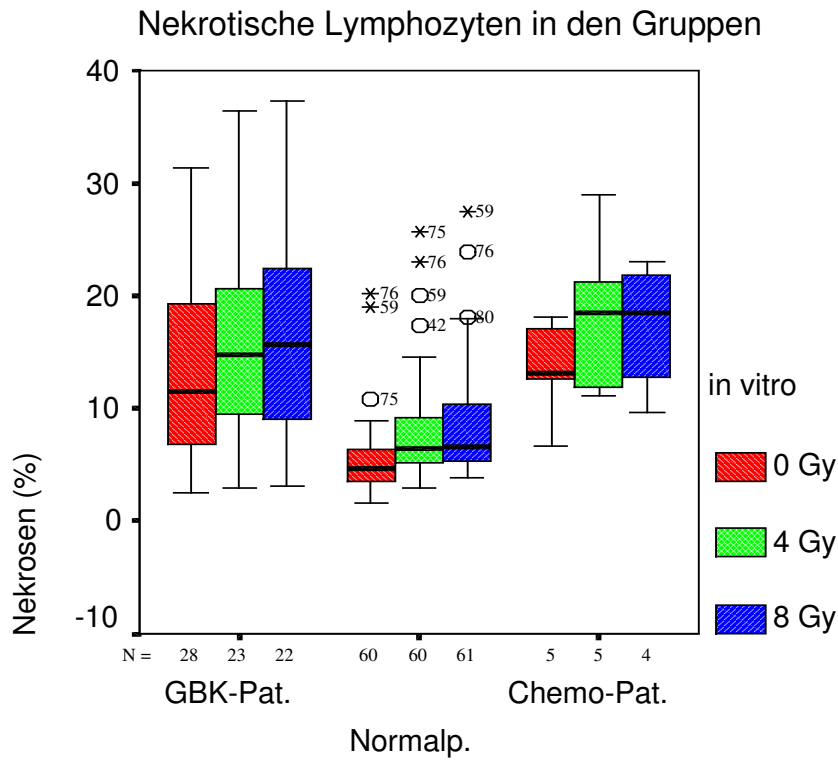


Abbildung 12c Verteilung der Nekrosen in den Gruppen nach in vitro-Bestrahlung und 72stündiger Inkubation. Deutlich werden die zu hohen Schädigungsraten

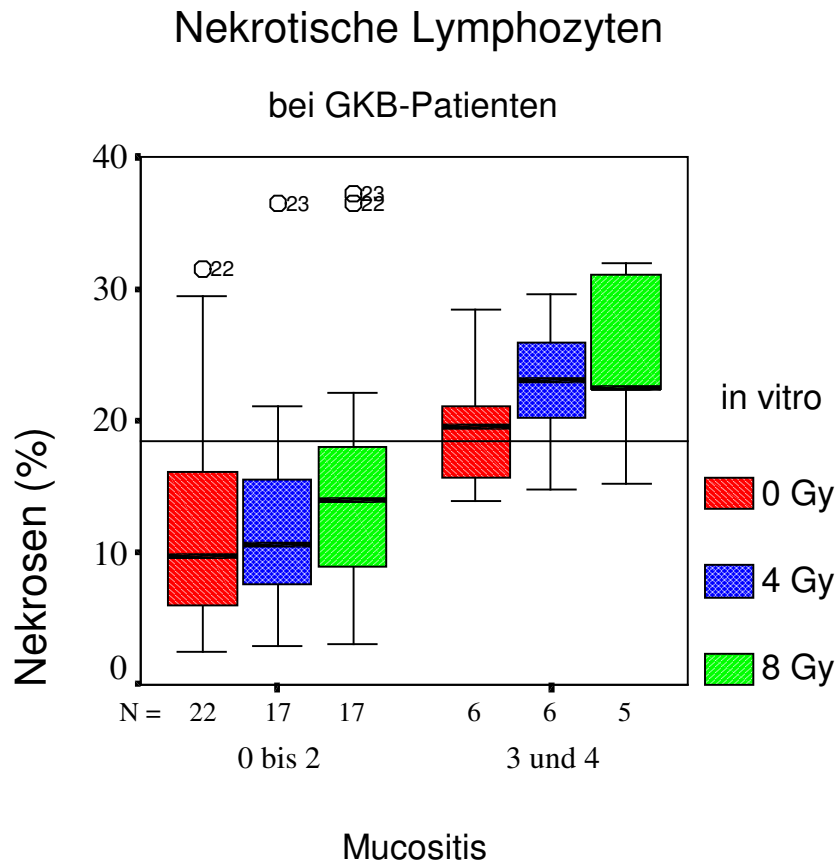


Abbildung 12d Boxplot-Darstellung des Zusammenhangs der Nekrose bei Lymphozyten in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis in vitro und dem Schweregrad der Mucositis bei GKB-Patienten. Verdeutlicht sind die signifikanten Unterschiede nach 4 und 8 Gy (p 0,031 bzw. 0,008).

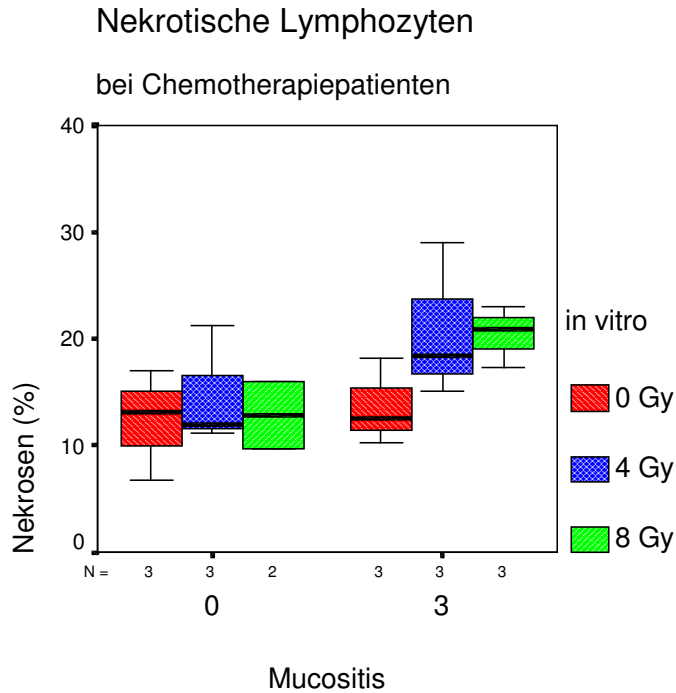


Abbildung 12e Boxplot-Darstellung des Zusammenhangs der Nekrose bei Lymphozyten in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis in vitro und dem Schweregrad der Mucositis bei Chemotherapie-Patienten.

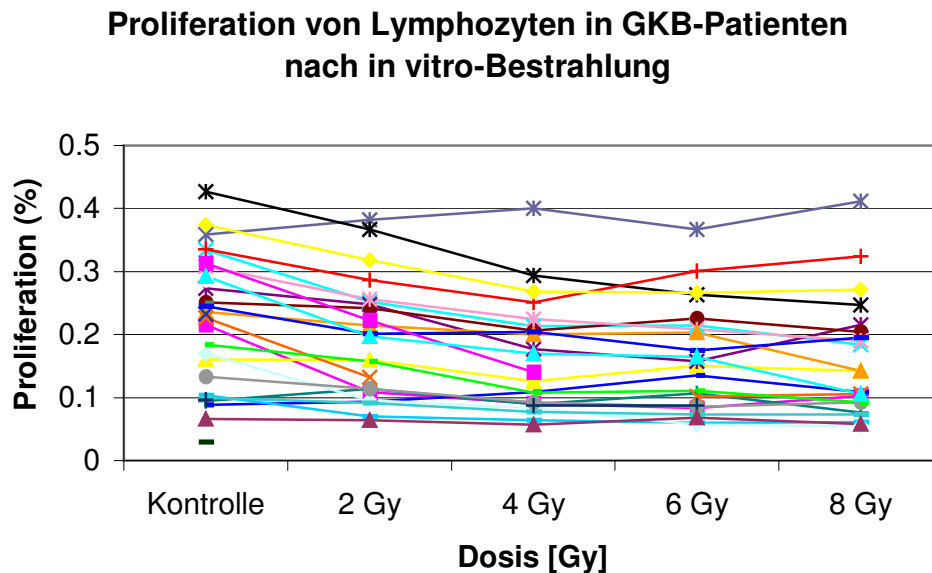


Abbildung 13a Dosis-Wirkungskurven für den Anteil proliferierender Lymphozyten von GKB-Patienten nach in vitro-Bestrahlung. Zu erkennen ist eine tendenzielle Abnahme ohne große Schwankungen für jeden Patienten.

Mucositis und Zellproliferation

in GKB-Patienten

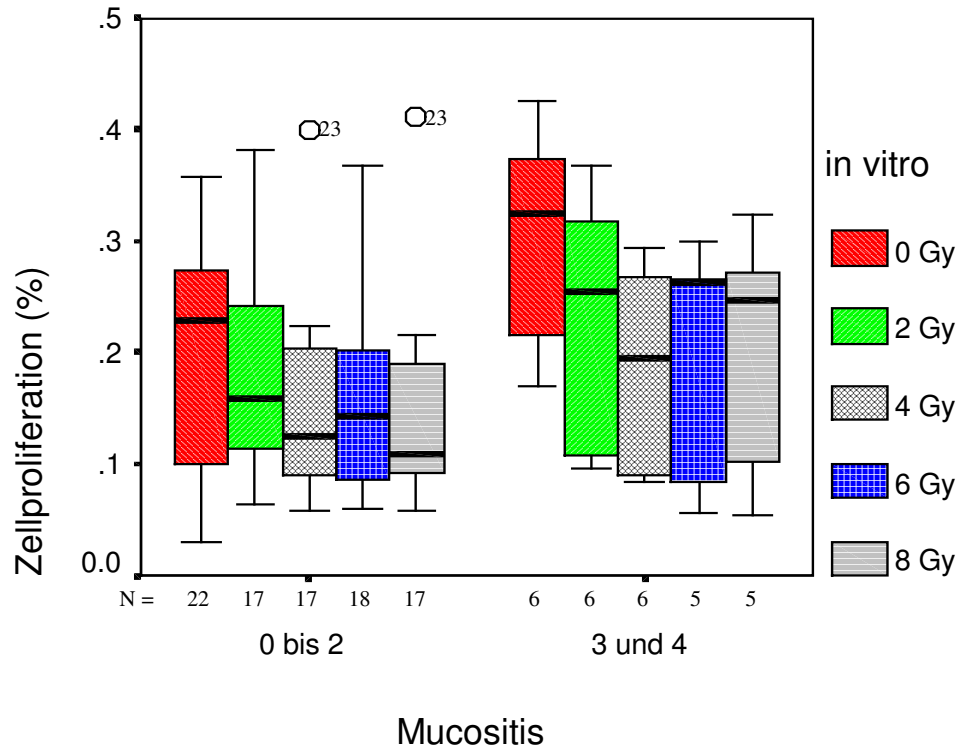


Abbildung 13b Boxplot-Darstellung für die Proliferation von Lymphozyten von GKB-Patienten nach in vitro-Bestrahlung, Lymphozyten in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis in vitro und dem Schweregrad der Mucositis.

Prozentzahl proliferierender Lymphozyten in den Gruppen

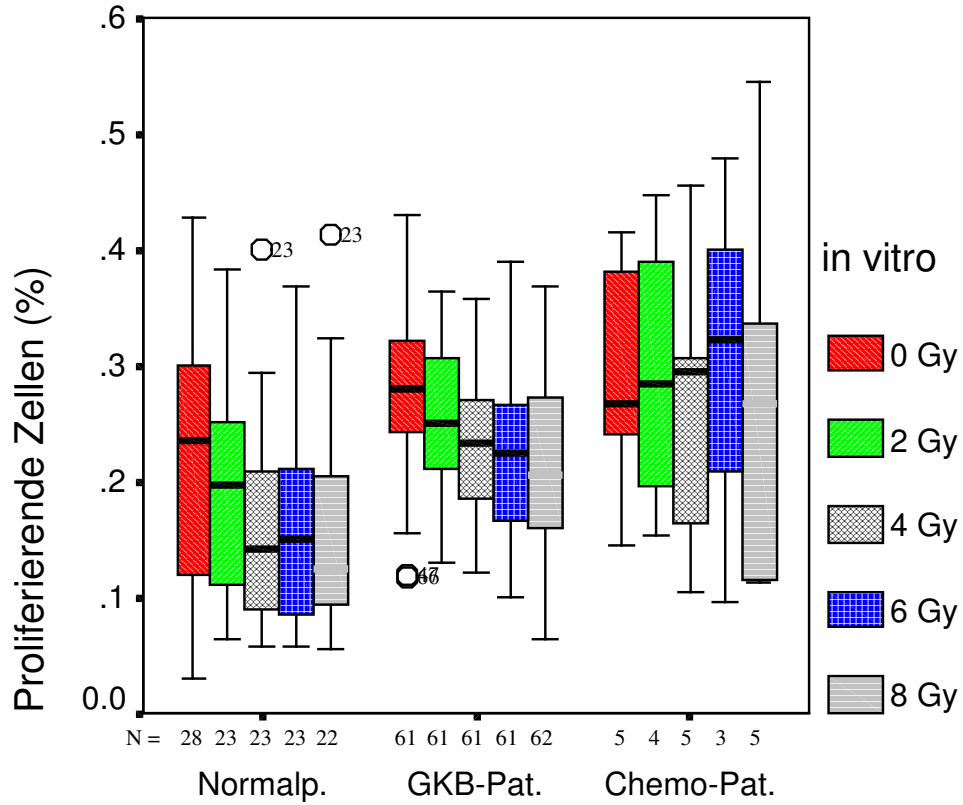


Abbildung 13c Anteil proliferierender Lymphozyten in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis in vitro. Vergleich der Gruppen.

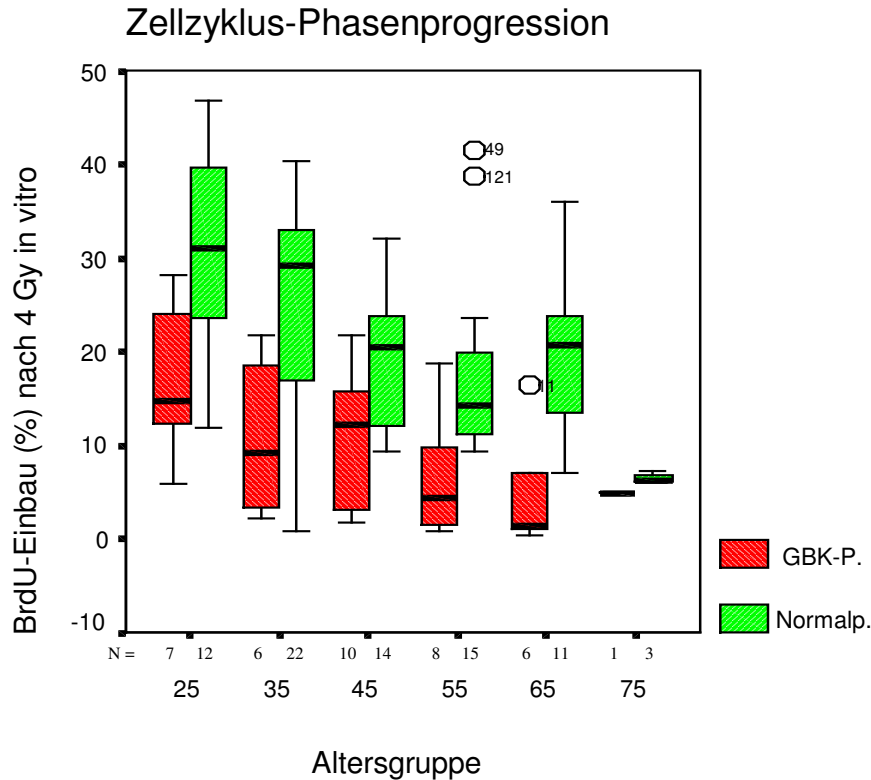


Abbildung 14a Zusammenhang von Zellzyklus-Phasenprogression und Alter der Personen. Deutlich zu erkennen ist ihre Altersabhängigkeit und die schwächere Ausprägung bei den Patienten.

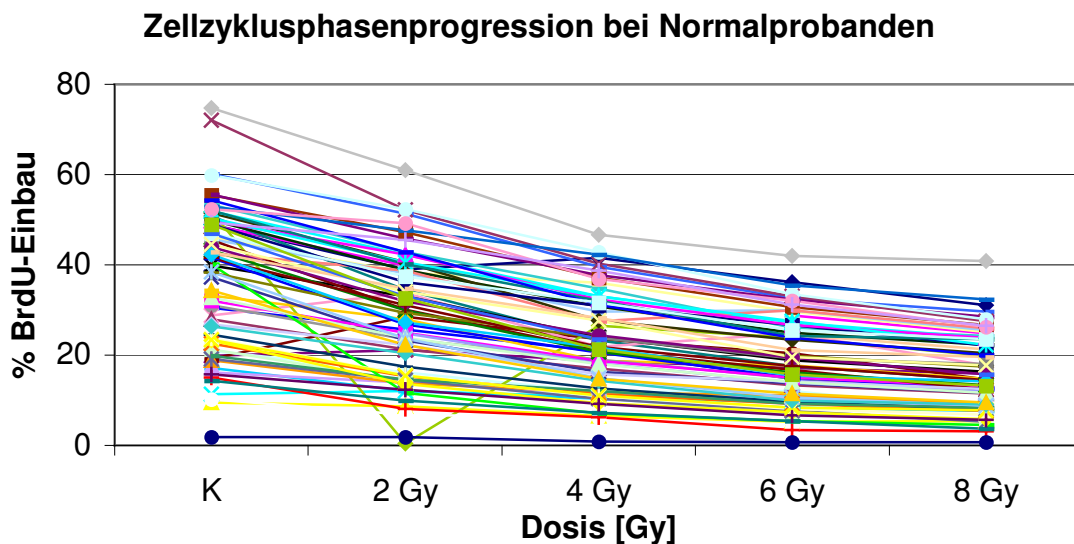


Abbildung 14b Dosis-Wirkungskurven für den Anteil proliferierender Lymphozyten von GKB-Patienten nach in vitro-Bestrahlung. Zu erkennen ist eine tendenzielle Abnahme ohne große Schwankungen für jeden Patienten.

Zellzyklusphasenprogression bei GKB-Patienten

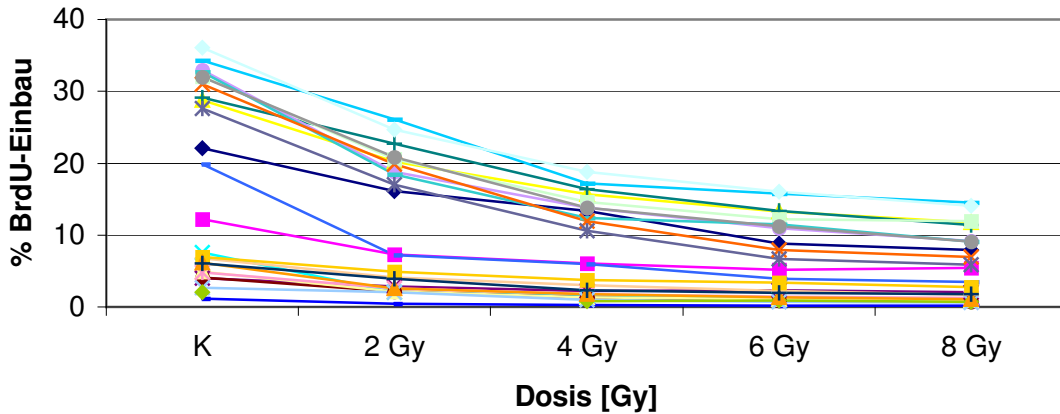


Abbildung 14c Dosis-Wirkungskurven für die Zellzyklus-Phasenprogression von Lymphozyten von GKB-Patienten nach in vitro-Bestrahlung. Zu erkennen ist eine tendenzielle Abnahme ohne große Schwankungen für jeden Patienten.

Zellzyklus-Phasenprogression bei Normalprobanden (1. Gruppe) und GKB-Patienten (Gruppe 2 und 3)

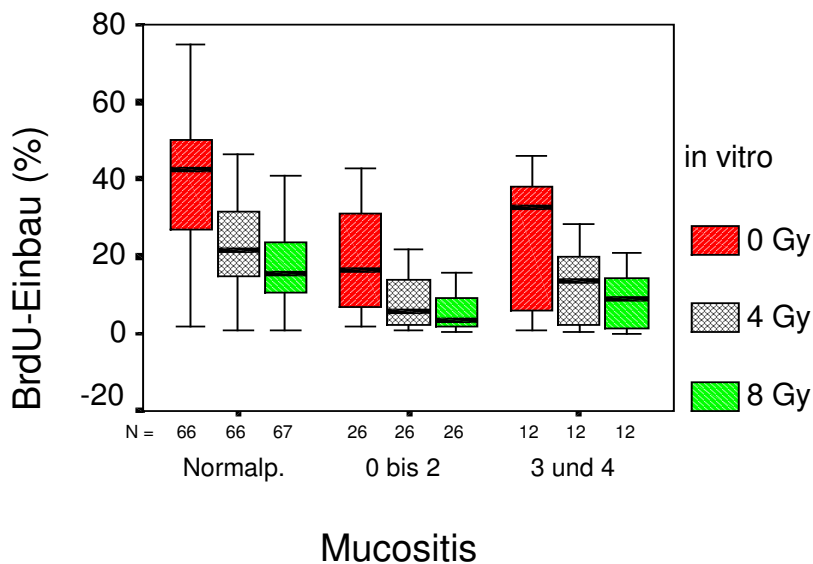


Abbildung 14d Vergleich der Zellzyklus-Phasenprogression von Lymphozyten von Normalprobanden und GKB-Patienten nach in vitro-Bestrahlung. Zu erkennen ist eine dosisabhängige Abnahme bei allen und tendenziell höhere Werte bei Patienten mit schwerer Mucositis als mit schwacher Mucositis.

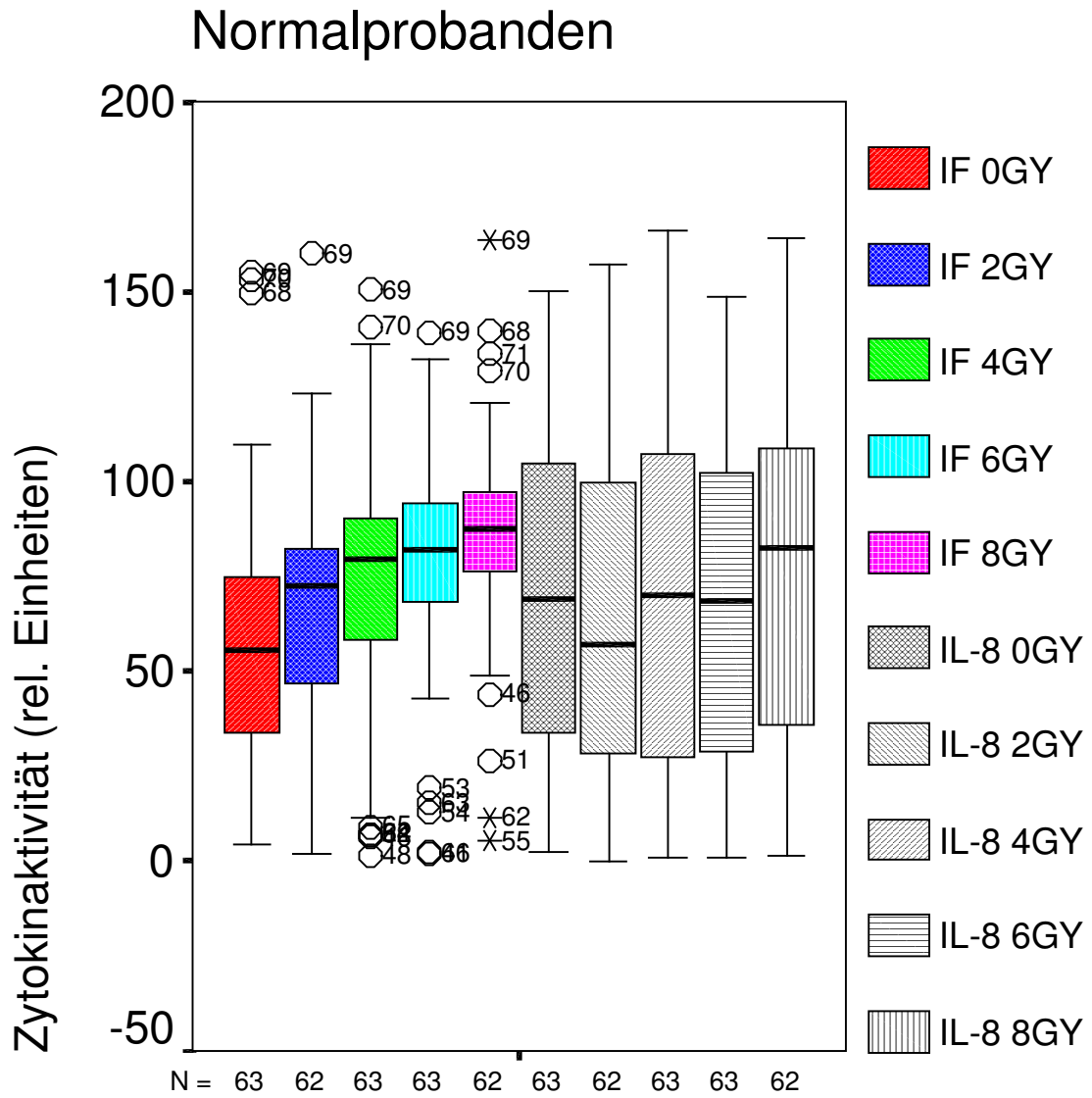
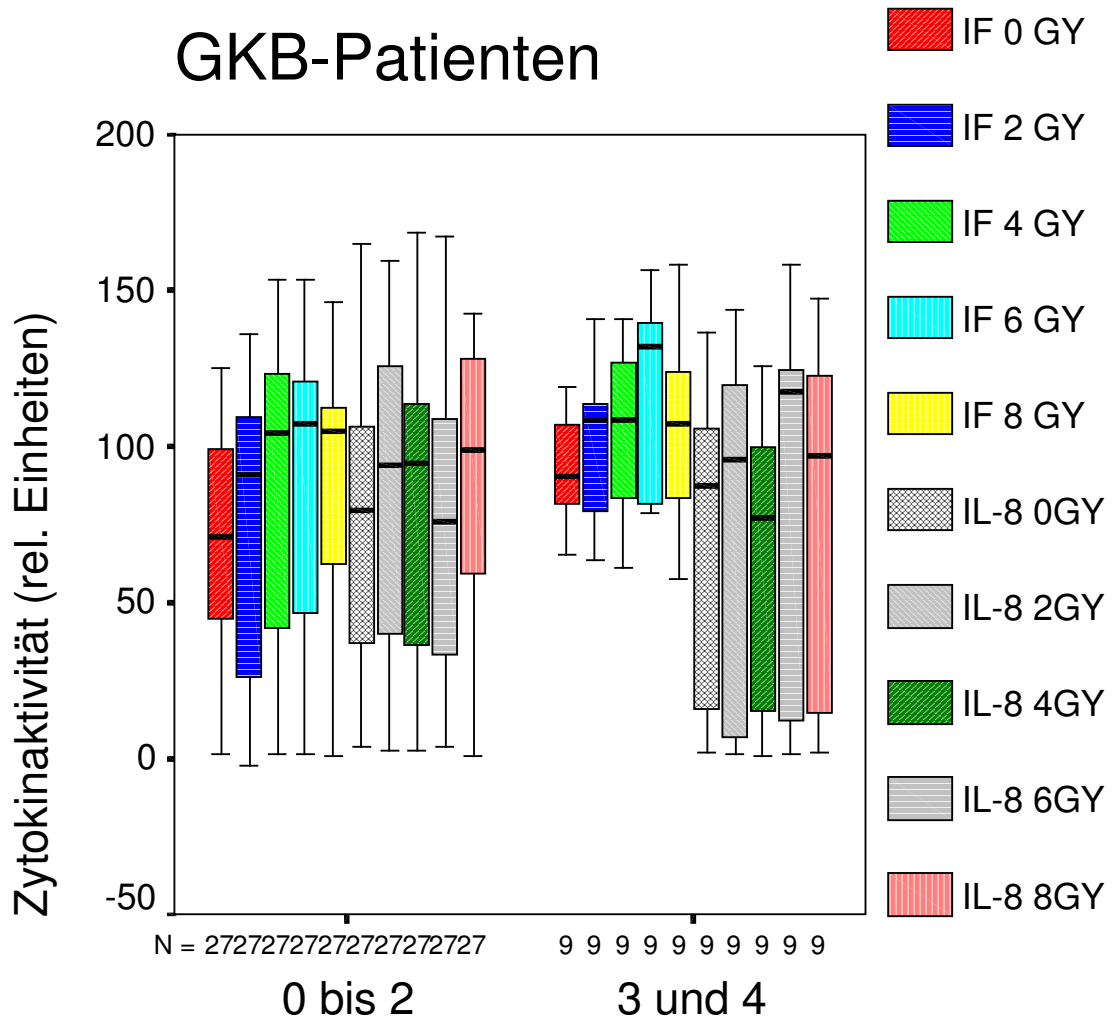


Abbildung 15a Aktivität der Zytokine IFN γ und IL-8 nach in vitro-Bestrahlung von Blut von Normalprobanden



Mucositis

Abbildung 15b Aktivität der Zytokine IFN γ und IL-8 nach in vitro-Bestrahlung von Blut von GKB-Patienten

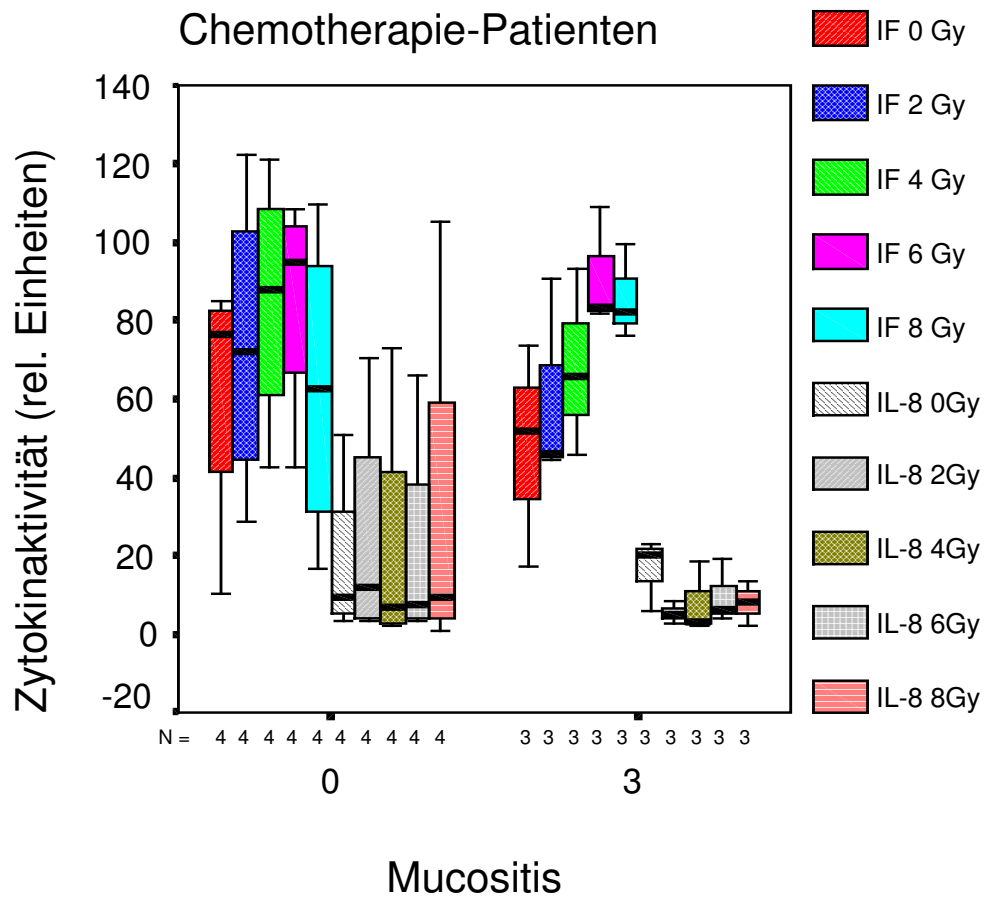


Abbildung 15c Aktivität der Zytokine IFN γ und IL-8 nach in vitro-Bestrahlung von Blut von Chemotherapie-Patienten

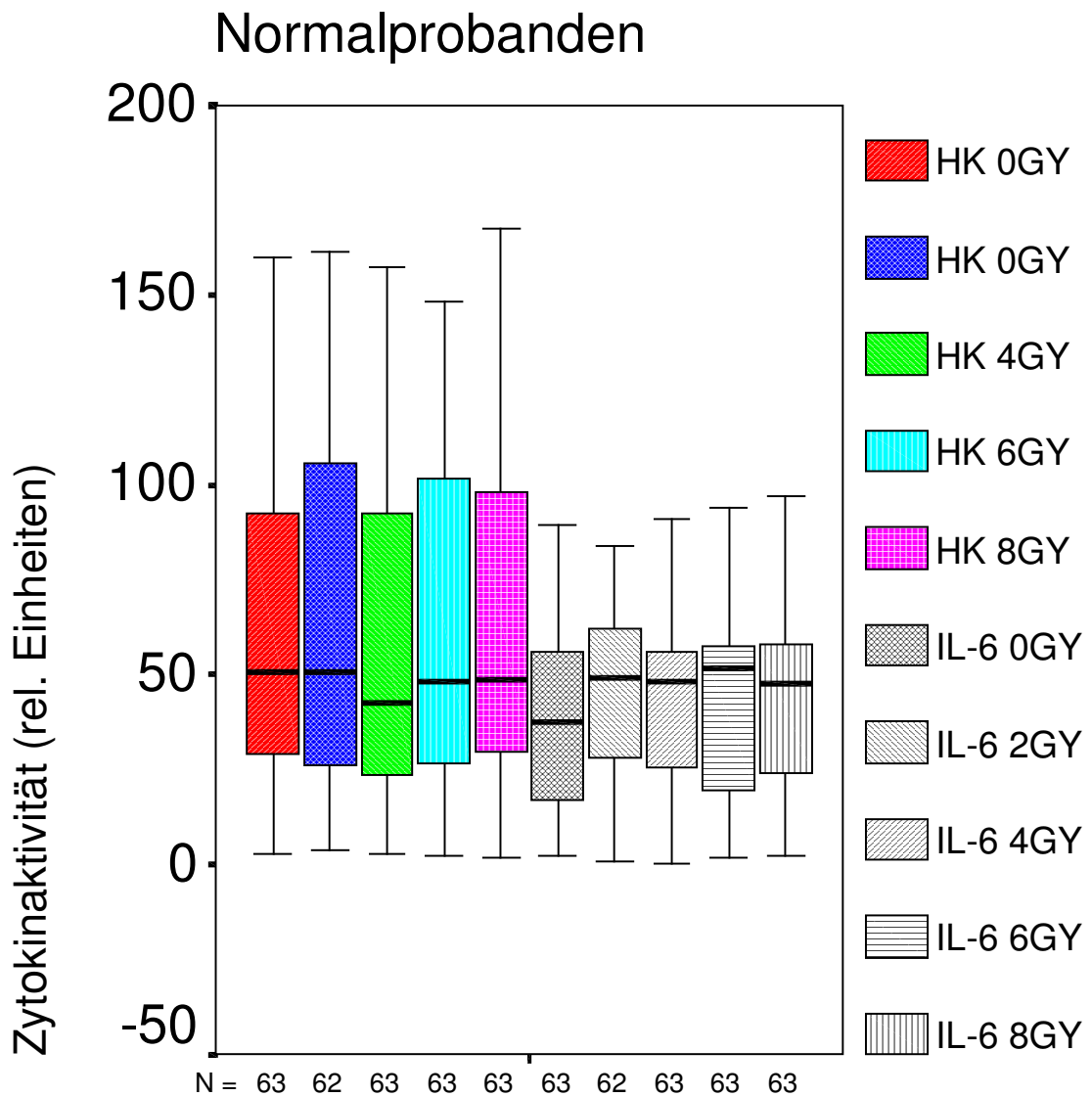


Abbildung 15d Aktivität des Kontrollgens PBDA („HK“) und des Zytokins IL-6 nach in vitro-Bestrahlung von Blut von Normalprobanden

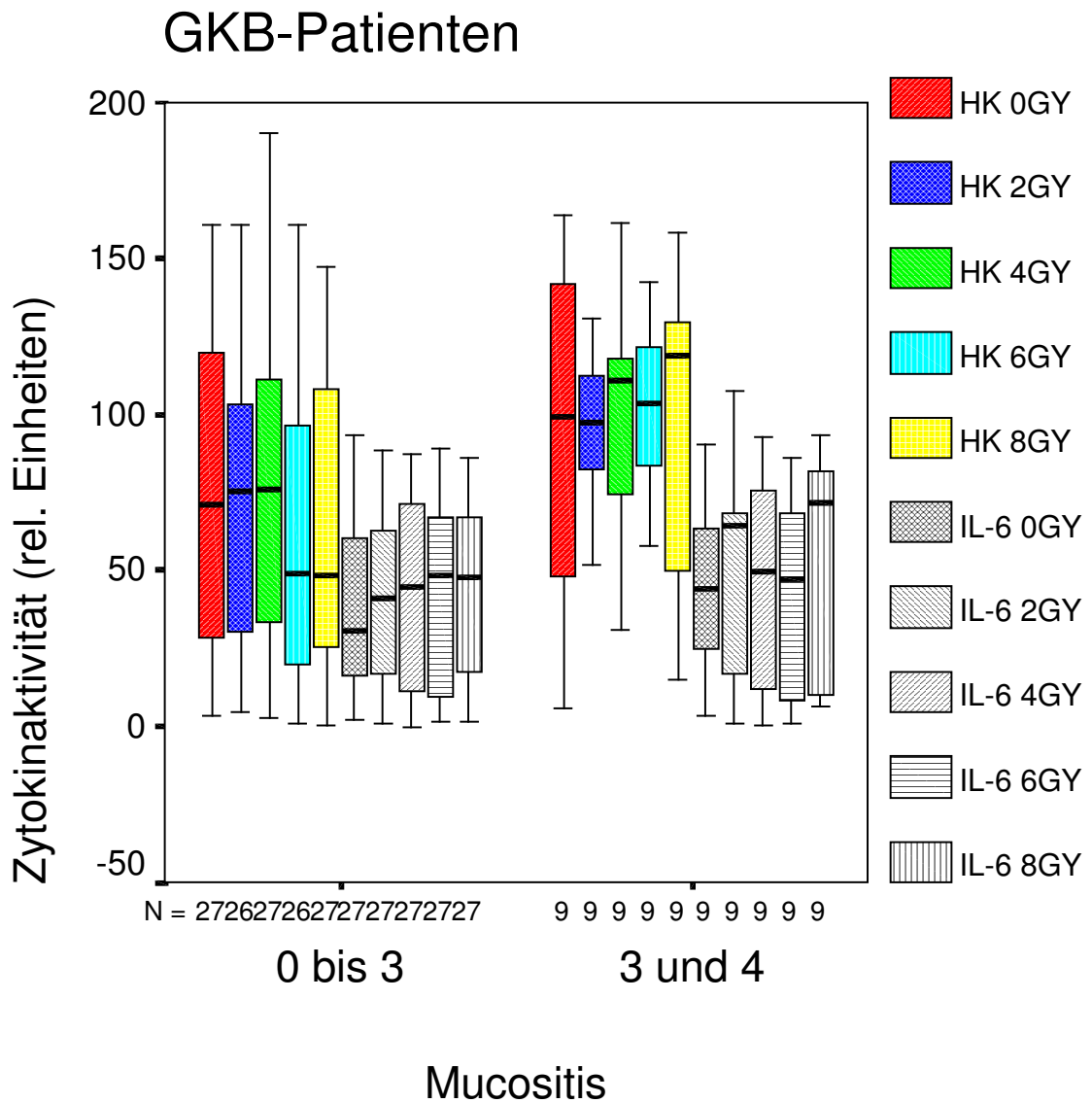


Abbildung 15e Aktivität des Kontrollgens PBDA („HK“) und des Zytokins IL-6 nach in vitro-Bestrahlung von Blut von GKB-Patienten

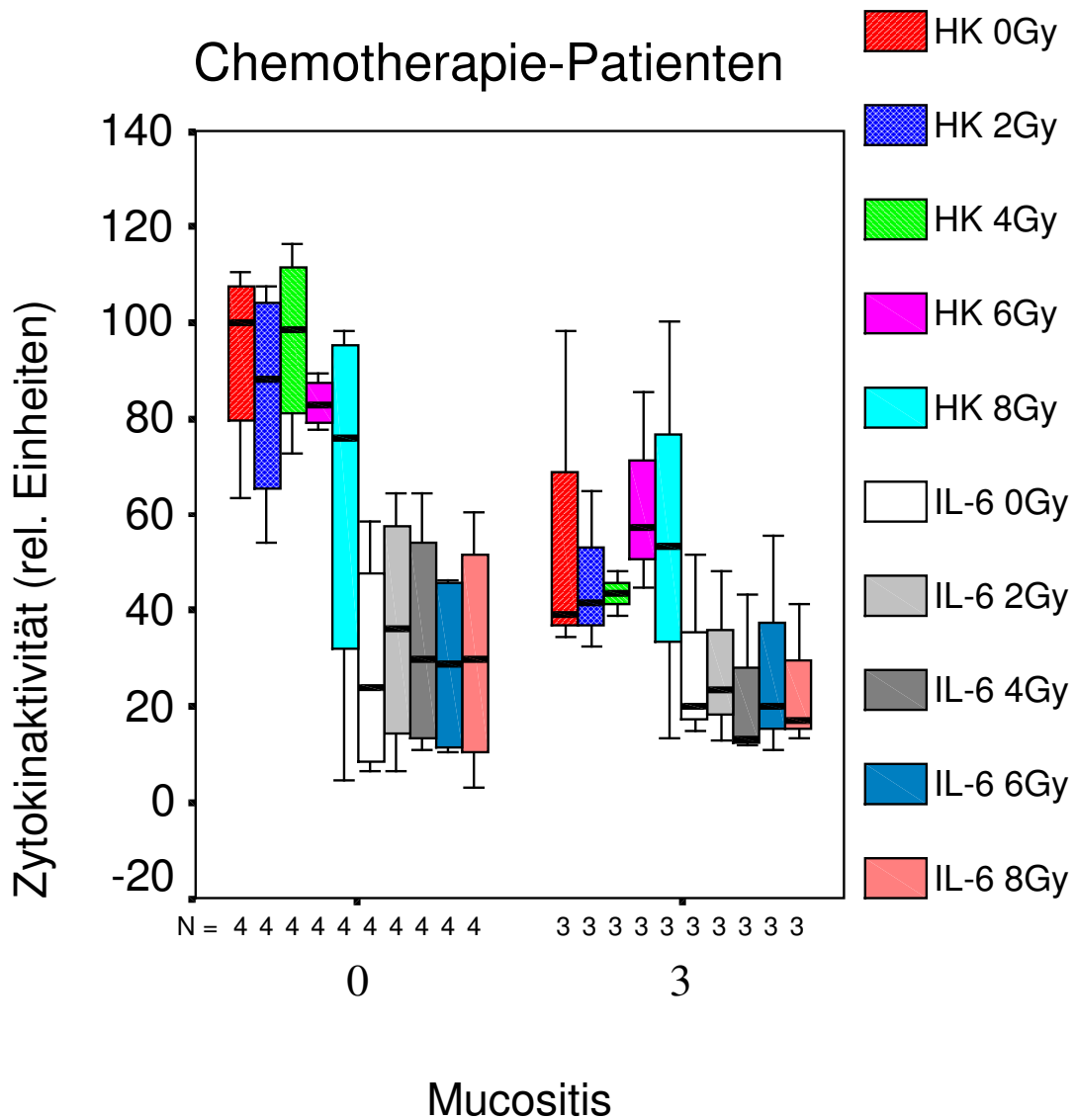


Abbildung 15f Aktivität des Kontrollgens PBDA („HK“) und des Zytokins IL-6 nach in vitro-Bestrahlung von Blut von Chemotherapie-Patienten

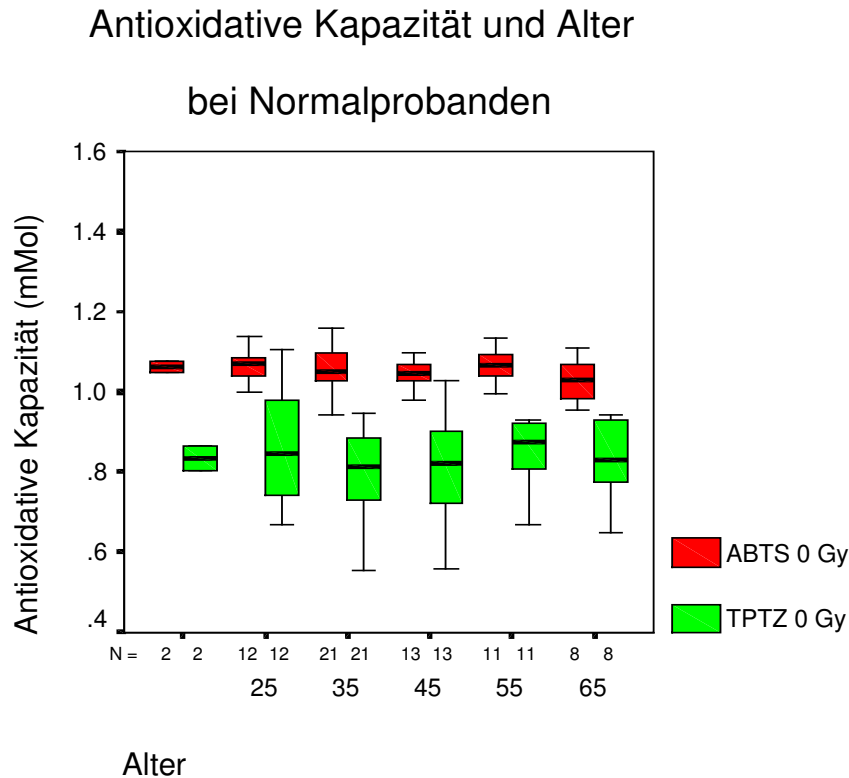


Abbildung 16a Antioxidative Kapazität gemessen mit dem ABTS- und TPTZ-Test und Verteilung der Altersgruppen bei Normalprobanden

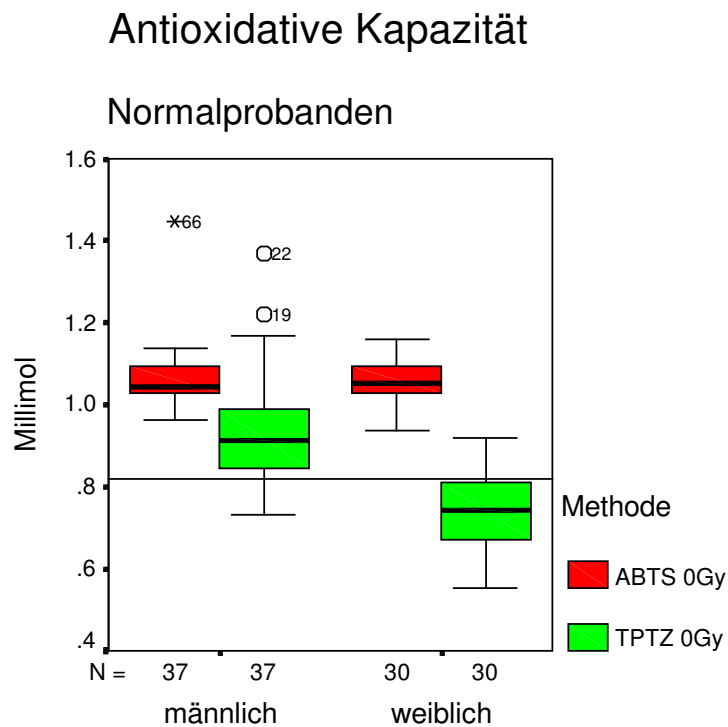
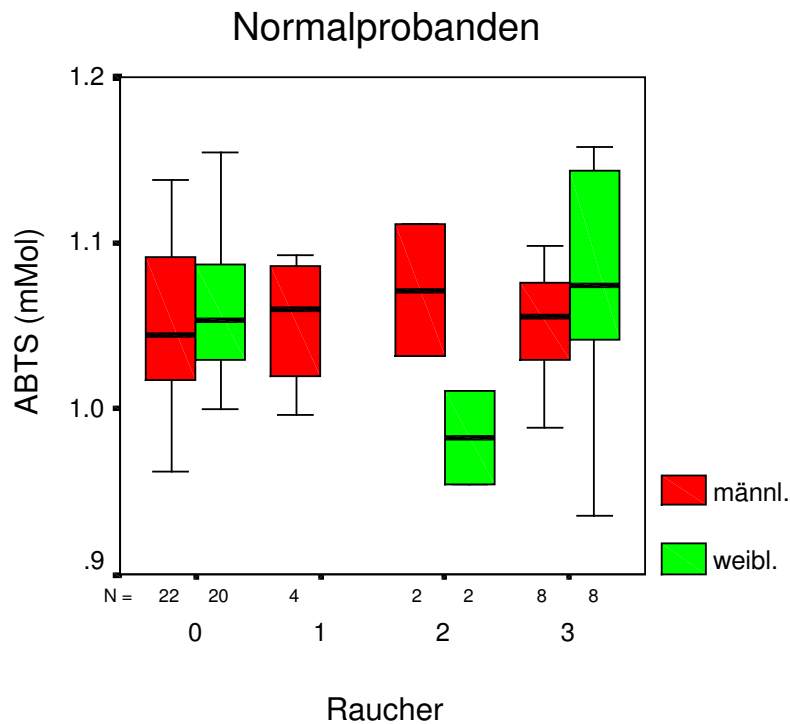


Abbildung 16b AOK gemessen mit dem ABTS- und TPTZ-Test und Verteilung auf das Geschlecht der Normalprobanden. Trennlinie bei 0,82 mMol.

Antioxidative Kapazität und Geschlecht



Antioxidative Kapazität und Geschlecht

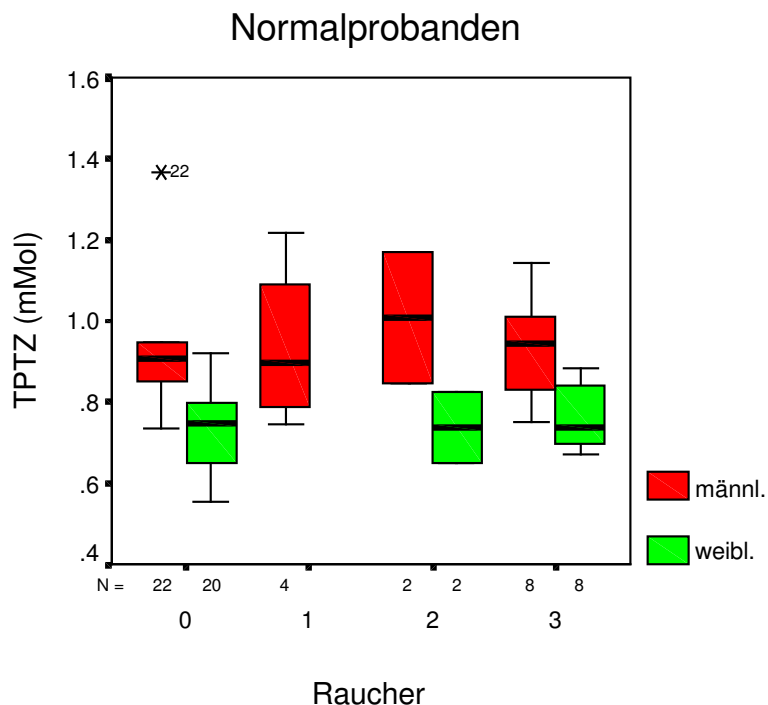
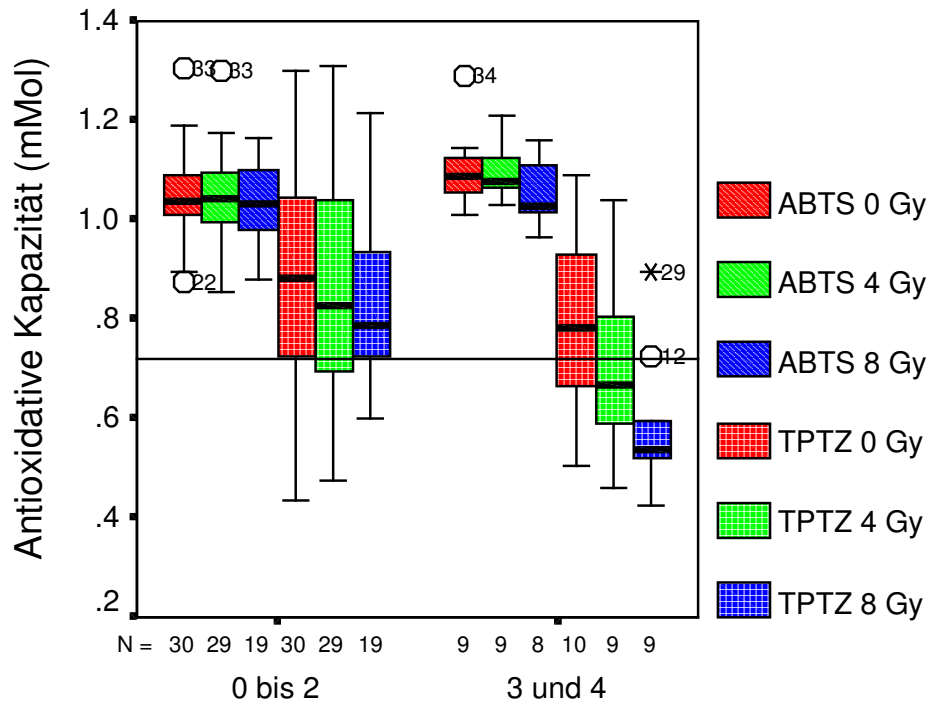


Abbildung 16c AOK gemessen mit dem ABTS-Test (oben) und dem TPTZ-Test (unten) unter Berücksichtigung von Raucherstatus und Geschlecht von Normalprobanden. 0 = Nichtraucher, 1 = ehemaliger Raucher, 2 = Gelegenheitsraucher, 3 = starker Raucher.

Antioxidative Kapazität und Mucositis

bei GKB-Patienten



Mucositis (Grad)

Abbildung 16d Boxplots zur Messung der AOK mit dem ABTS und dem TPTZ-Test im Patientenblut nach in vivo-Bestrahlung mit 4 und 8 Gy. Während der ABTS-Test keinen Unterschied zwischen Patienten ohne oder mit leichter Mucositis gegenüber denen mit schwerer Mucositis deutlich macht, lässt der TPTZ-Test diesen Unterschied für beide Dosen sichtbar werden (p 0,038 und 0,001).

Die Trennlinie liegt bei 0,72 mMol.

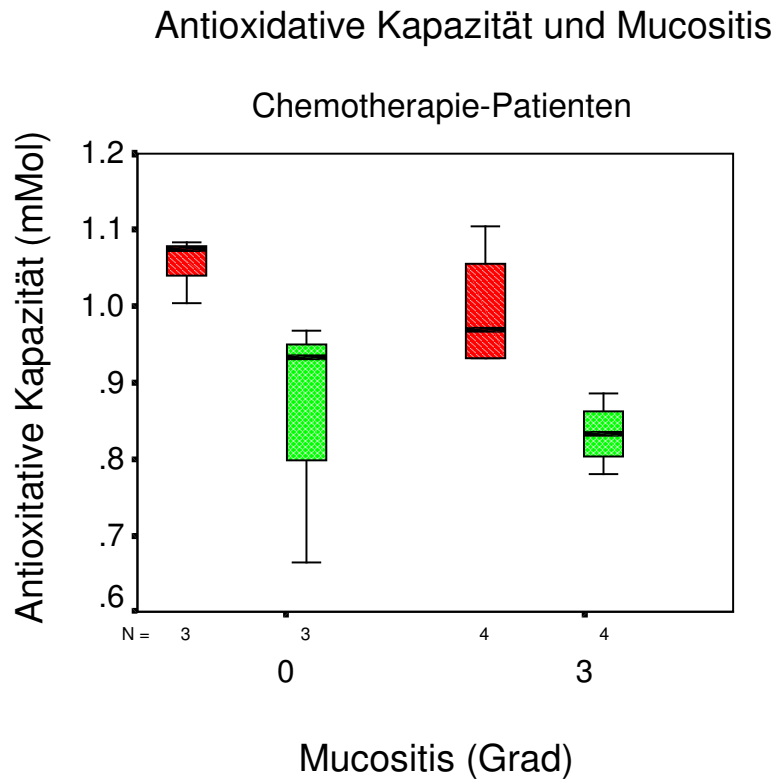


Abbildung 16e Boxplots zur Messung der AOK mit dem ABTS- und dem TPTZ-Test für Chemotherapie-Patienten ohne oder mit Mucositis 3.Grades. Es wird deutlich, dass die AOK hier keine Unterschiede für die Mucositis aufzeigt.

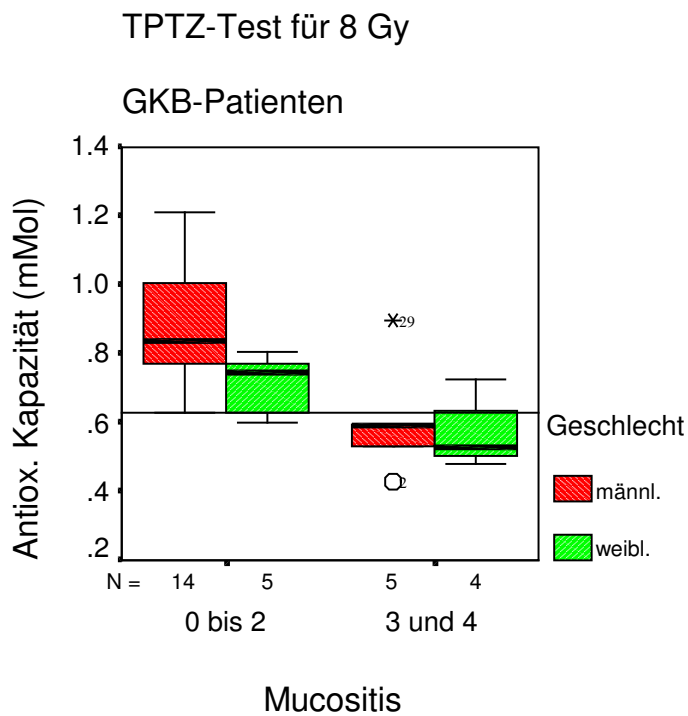
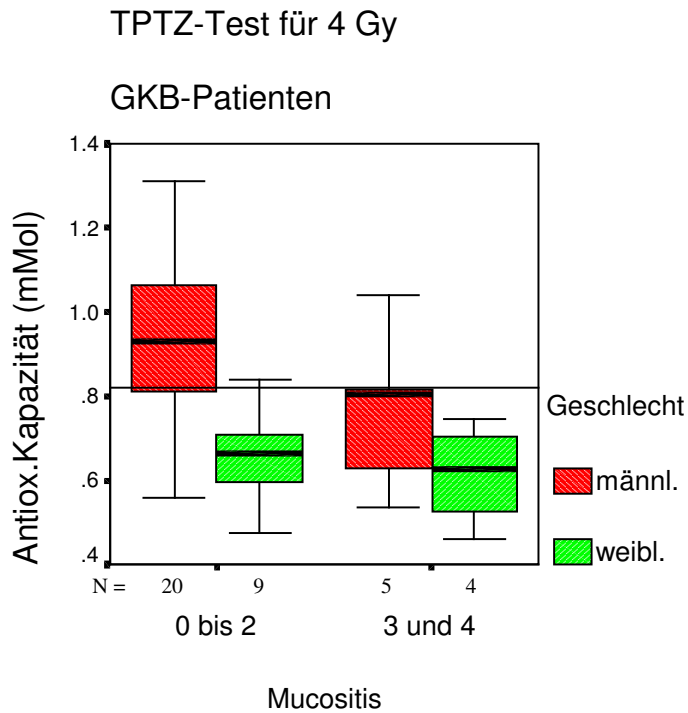


Abbildung 16f Nach Geschlecht und Mucositis-Schweregrad aufgeteilte AOK nach in vivo-Bestrahlung mit 4 Gy (oben) und 8 Gy (unten). Die Trennlinie liegt bei 0,82 mMol (für 4 Gy, oben) und 0,63 mMol. (für 8 Gy, unten).