

Aus der Klinik für
Strahlentherapie und Radioonkologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Ch. Rube

**Über die Bedeutung der in vivo Doppelstrangbruch-
Reparatur für die orale Mukositis in der Radiotherapie
bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2011

vorgelegt von
Katharina Seegmüller,
geb. am 11.06.1984 in Zweibrücken

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis.....	8
1. Zusammenfassung.....	9
2. Einleitung.....	11
2.1 Kopf-Hals-Karzinome.....	11
2.1.1 Epidemiologie.....	11
2.1.2 Therapie.....	12
2.2 Orale Mukositis als akute Strahlennebenwirkung.....	13
2.2.1 Klinisches Bild.....	13
2.2.2 Pathophysiologie.....	14
2.2.3 Therapie.....	15
2.2.4 Einflussfaktoren.....	15
2.3 Doppelstrangbrüche.....	17
2.3.1 DSB-Reparatur.....	17
2.3.2 Veränderung des Chromatins an einem DSB.....	18
2.3.3 Nachweis von DSB mittels γ H2AX.....	20
2.4 Radiosensitivität.....	21
2.4.1 Erkrankungen mit eingeschränkter DSB-Reparatur.....	21
2.4.2 Strahlensensible Patienten.....	22
2.5 Prädiktive Tests.....	23
2.6 Zielsetzung.....	24
3. Patienten, Material und Methoden.....	25
3.1 Ein- und Ausschlusskriterien.....	25
3.2 Therapie.....	26
3.2.1 Operation.....	26

3.2.1	Chemotherapie.....	26
3.2.2	Radiotherapie.....	26
3.3	Bestimmung der γH2AX-Foci	29
3.3.1	Blutentnahme.....	29
3.3.2	Lymphozytenaufbereitung.....	29
3.3.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	30
3.4	Dokumentation der oralen Mukositis	32
3.5	Auswertung	34
3.5.1	Reparaturparameter.....	34
3.5.2	Auswertungsprogramme.....	34
4.	Ergebnisse	36
4.1	Patientenkollektiv	36
4.2	Orale Mukositis	39
4.2.1	Ausprägung der oralen Mukositis.....	39
4.2.2	Bestrahltes Volumen.....	40
4.2.3	Dosisbelastung in der Mundhöhle und im Oropharynx.....	41
4.3	DSB nach Radiotherapie	43
4.3.1	Im Gesamtkollektiv.....	43
4.3.2	Ermittelte γ H2AX-Fociverteilung im Vergleich.....	45
4.3.3	Beide Patientengruppen im Vergleich.....	46
4.3.4	Beide WHO-Gruppen im Vergleich.....	47
4.4	DSB-Reparaturparameter	48
4.4.1	Verteilung des Reparaturparameters RQ24.....	48
4.4.2	Einfluss der Reparatur auf die Mukositisausprägung.....	49
4.4.3	Reparaturparameter RQ2,5 und RQ5.....	51
5.	Diskussion	54
5.1	Betrachtungen zur Methode	55

5.1.1	Mukositisdokumentation	55
5.1.2	Charakteristika der γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode	55
5.1.3	Korrelation der γ H2AX-Foci mit DSB	56
5.1.4	Einfluss der Chemotherapie	58
5.2	Beurteilung der Ergebnisse	60
5.2.1	Verteilung der Mukositisausprägung	60
5.2.2	DSB-Reparatur	61
5.2.3	Reparaturparameter	63
5.3	Diskussion der Ergebnisse im Kontext der Literatur	65
5.3.1	Ergebnisvergleich mittels γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode	65
5.3.2	Ergebnisvergleich mittels Alternativmethoden	67
5.4	Ausblick	69
5.4.1	Bestimmung der γ H2AX als prädiktiver Test	69
5.4.2	γ H2AX als therapeutischer Ansatzpunkt	70
6.	Literaturverzeichnis	71
7.	Publikation	86
8.	Danksagung	87
9.	Lebenslauf	88

Abkürzungsverzeichnis

53PB1	<i>p53-binding protein 1</i>
AT	Ataxia telangiectasia
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated kinase</i>
ATR	<i>ATM- and RAD3 related kinase</i>
bzw.	beziehungsweise
CUP	<i>cancer of unknown primary origin</i> , Tumor mit unbekanntem Primärtumor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA PK	<i>DNA dependent Proteinkinase, DNS abhängige Proteinkinase</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
ESTRO	<i>European Society for Therapeutic Radiology and Oncology</i> , Europäische Gesellschaft für Strahlentherapie und Onkologie
et al.	<i>et alii</i> , und andere
5-FU	5-Fluoruracil
g	Erdbeschleunigung (Standardwert $g = 9,80665 \text{ m/s}^2$)
Gy	Gray
h	Stunde
HR	<i>Homologous recombination</i> , homologe Rekombination
IL	Isodosenlinie
i.v.	<i>intravenös</i> , Gabe über die Vene
KOF	Körperoberfläche
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
Mre11	<i>Meiotic recombination protein 11</i>
MCPH1	<i>Microcephalin 1</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NBS	Nijmegen breakage Syndrom
NBS 1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>
NHEJ	<i>Non homologous End-Joining</i> , nicht homologes End-Joining
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PBS/NS	PBS mit Normalserum

p.o.	<i>per os</i> , Gabe über den Mund
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i> , Pulsfeldgelelektrophorese
PIKK	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases</i>
RCT	Radiochemotherapie
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RQ24	Reparaturquotient mit dem γ H2AX-Fociverhältnis von 30 Minuten zu 24 h
RQ5	Reparaturquotient mit dem γ H2AX-Fociverhältnis von 5 h zu 24 h
RQ2,5	Reparaturquotient mit dem γ H2AX-Fociverhältnis von 2,5 h zu 5 h
rpm	<i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Radiotherapie
SD	Standardabweichung
TNM	<i>Tumor, nodes, metastases</i> , Tumor, Lymphknoten, Metastasen
UICC	<i>Union International Contre le Cancer</i> , internationale Vereinigung gegen Krebs
VDJ	<i>V - variable, D - diversity, J – joining</i>
V50	prozentualer Anteil der Mundhöhle und des einsehbaren Oropharynx, auf den mehr als 50 Gy appliziert wurde
V30	prozentualer Anteil der Mundhöhle und des einsehbaren Oropharynx, auf den mehr als 30 Gy appliziert wurde
vs.	<i>versus</i> , gegenüber
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der oralen Mukositis nach WHO Schema von 1979	32
Tabelle 2: Patientenliste.....	36
Tabelle 3: Patientenkollektiv.....	38
Tabelle 4: Mukositisausprägung.....	39
Tabelle 5: Volumen der 50 %- und 80 %-IL.....	40
Tabelle 6: Dosisbelastung der Mundhöhle und des einsehbaren Oropharynx	41
Tabelle 7: γ H2AX-Fociwerte im Verlauf RT+RCT, RT, RCT.....	43
Tabelle 8: Poisson-Verteilung	45
Tabelle 9: Kreuztabelle RQ24 RT+RCT	49
Tabelle 10: Kreuztabelle RQ24 RT.....	49
Tabelle 11: Kreuztabelle RQ24 RCT	49
Tabelle 12: Kreuztabelle RQ5 RT+RCT	52
Tabelle 13: Kreuztabelle RQ5 RT	53
Tabelle 14: Kreuztabelle RQ5 RCT	53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dosis-Volumen-Histogramm.....	28
Abbildung 2: Volumen der 80 %-IL RT vs. RCT	40
Abbildung 3: Dosisbelastung RT vs. RCT	42
Abbildung 4: γ H2AX-Focianzahl RT+RCT	43
Abbildung 5: Darstellung der γ H2AX-Foci in der Immunfluoreszenz	44
Abbildung 6: γ H2AX-Focianzahl RT vs. RCT	46
Abbildung 7: γ H2AX-Focianzahl WHO ≤ 2 vs. WHO ≥ 3	47
Abbildung 8: Verteilung RQ24.....	48
Abbildung 9: RQ24 und orale Mukositis RT+RCT, RT, RCT	50
Abbildung 10: RQ2,5 und orale Mukositis RT vs. RCT.....	51
Abbildung 11: RQ5 und orale Mukositis RT vs. RCT.....	52

1. Zusammenfassung

Hintergrund: Akute Strahlennebenwirkungen in der Radiotherapie sind multifaktoriell bedingt und durch eine große interindividuelle Variabilität gekennzeichnet.

Diese Studie untersucht den Einfluss der individuellen in vivo Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur auf die Inzidenz der höhergradigen oralen Mukositis an einem Patientenkollektiv mit Kopf-Hals-Karzinomen mit Indikation zur adjuvanten Radiotherapie (RT) oder Radiochemotherapie (RCT).

Patienten, Material und Methoden: Bei 31 Patienten mit einem Kopf-Hals-Karzinom und adjuvanter RT oder RCT wurde die DSB-Reparaturkinetik mittels Bestimmung der γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode untersucht. γ H2AX-Foci, die DSB über Chromatinveränderungen markieren, wurden vor der ersten Bestrahlungsfraktion sowie nach 0,5 h; 2,5 h; 5 h und 24 h erfasst. Primäres Studienanliegen war die Überprüfung einer Korrelation zwischen dem Ausmaß aus residueller γ H2AX-Focianzahl zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb von 24 Stunden nach der ersten Bestrahlung und der nach WHO klassifizierten maximalen Mukositisausprägung. Um die Dosisbelastung der oralen Mukosa zu berücksichtigen, wurden entsprechende Dosisvolumenhistogramme ausgewertet.

Ergebnisse: Bezüglich der initial entstandenen γ H2AX-Foci sowie der prozentualen Reparatur innerhalb der ersten 24 Stunden unterschieden sich die beiden Therapiegruppen (RT vs. RCT) nicht. Nur in der RT-Gruppe hatten Patienten mit höhergradiger oraler Mukositis (WHO Grad ≥ 3) eine verzögerte Reparatur, während ein solcher Unterschied nicht für Patienten mit simultaner Chemotherapie demonstriert werden konnte.

Ein Zusammenhang zwischen der Dosisexposition der Mundhöhle und der Ausprägung der oralen Mukositis konnte nicht gefunden werden.

Schlussfolgerung: Mit der Einschränkung der geringen Patientenzahl geben die Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass es bei mangelnder Reparatur innerhalb der ersten 24 Stunden nach einer Radiotherapie zu einem gehäuftem Auftreten einer höhergradigen oralen Mukositis kommt. Interessanterweise ist dieser Zusammenhang bei Patienten mit einer RCT, bei denen die orale Mukositis wesentlich von der Chemotherapie beeinflusst wird, nicht nachweisbar.

The impact of individual in vivo repair of double-strand breaks on oral mucositis in adjuvant radiotherapy of head-and-neck cancer patients

Purpose: During radiotherapy the acute side effects are shaped by a large range of individual reactions based on a multifactorial genesis. This study evaluates the impact of individual in vivo double-strand break (DSB) repair on the incidence of severe oral mucositis in patients with head-and-neck cancer undergoing adjuvant radiotherapy (RT) or radiochemotherapy (RCT).

Patients, materials and methods: In thirty-one patients undergoing adjuvant RT or RCT DSB repair was measured with the γ H2AX method indicating DSB by chromatin modification. γ H2AX-Foci in blood lymphocytes were quantified before and 0.5h, 2.5h, 5h and 24 h after the first fraction of RT. The proportion of γ H2AX-Foci-loss at different points in time within the first 24 hours was correlated to the maximum mucositis-scores documented by WHO classification. Additionally, dose volume histograms were generated to evaluate the irradiation dose exposure of oral mucosa.

Results: In both groups there was no difference between the initial number of γ H2AX-Foci as well as the proportional DSB repair within the first 24 hours (RT vs. RCT). In the RT-group patients with impaired repair showed an increased incidence of severe oral mucositis (WHO grade ≥ 3).

No correlation was found between the dose exposure of the oral cavity and the mucositis score.

Conclusions: The results suggest the identification of patients with an increased incidence of severe mucositis by impaired DSB repair within the first 24 h after radiotherapy but have to be interpreted cautiously because of the small number of patients. Interestingly we failed to demonstrate this correlation in the RCT-group in which the mucositis seems to be dominated by the chemotherapy.

2. Einleitung

2.1 Kopf-Hals-Karzinome

2.1.1 Epidemiologie

Unter den Begriff der Kopf-Hals-Karzinome fallen bösartige Tumore der Mundhöhle, des Oropharynx, des Hypopharynx, des Larynx und des Nasopharynx. Dabei handelt es sich fast ausnahmslos um Plattenepithelkarzinome.

Mit ungefähr 13.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland sind im Wesentlichen Patienten im fünften und sechsten Lebensjahrzehnt betroffen. Kopf-Hals-Karzinome nehmen bei den Männern in Deutschland den siebten Rang der Krebsneuerkrankungshäufigkeiten ein. Im Gegensatz dazu treten Kopf-Hals-Karzinome bei Frauen seltener auf und sind auf dem 15. Rang zu finden. Im deutschlandweiten Vergleich liegt im Saarland mit 35,2 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner bei Männern und 8,5 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner bei Frauen die höchste Inzidenz vor. Dabei stellt das Larynxkarzinom die häufigste vorkommende Entität dar. Je nach Tumorentität und Tumorausdehnungsstadium variieren die Therapieoptionen und das 5-Jahres-Überleben. Die günstigsten 5-Jahres-Überlebensraten haben Lippenkarzinome mit bis zu 90 % und die ungünstigsten Hypopharynxkarzinome mit 30 %. Jährlich versterben deutschlandweit 2.800 Männer und 1.200 Frauen an diesem Tumorkollektiv (Robert Koch Institut, 2008).

Als Hauptrisikofaktoren für Kopf-Hals-Karzinome sind Tabak- und Alkoholkonsum zu nennen, was sich in einer bis zu sechsmal häufigeren Inzidenz bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern zeigt (Robert Koch Institut, 2008). Zusätzlich stellt eine schlechte Mundhygiene einen Risikofaktor dar (Moreno-Lopez LA et al., 2000). Die Entstehung von Oropharynxkarzinomen wird zusätzlich zu einem Teil auf humane Papillomviren als einen ursächlichen Faktor zurückgeführt (D'Souza G et al., 2007). Beim Larynxkarzinom wurden karzinogene Substanzen, wie zum Beispiel (z.B.) polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, bestätigt (Elci OC und Akpinar-Elci M, 2009).

2.1.2 Therapie

Das Therapiekonzept wird regelhaft interdisziplinär anhand des TNM-Stadiums, der Tumorlokalisation, des Karnofsky Index und der Komorbiditäten des Patienten erarbeitet. Im kurativen Ansatz kommen Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie in unterschiedlichen Kombinationen zum Einsatz.

In niedrigen Tumorstadien besteht die Option eines allein chirurgischen oder strahlentherapeutischen Vorgehens. Eine postoperative Radiotherapie ist bei höheren Tumorstadien (\geq pT2), bei einer onkologisch inkompletten Resektion, bei Vorliegen extrakapsulärer Lymphknotenmetastasen, bei einer perineuralen Invasion, bei \geq 2 Lymphknotenmetastasen oder beim Vorhandensein sehr großer Lymphknoten $>$ 3 cm notwendig (Peters LJ et al., 1993). Ein kombiniertes Vorgehen aus Operation und adjuvanter RCT ist bei Patienten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium $>$ pT2 und $>$ pN2 sowie inkompletten Resektionen angezeigt (Bernier J et al., 2004; Cooper JS et al., 2004).

Die am häufigsten verwendeten Chemotherapieregimes parallel zur Radiotherapie sind Cisplatin 100 mg/ m² KOF an den Tagen 1, 22 und 43 oder Cisplatin 20 mg/ m² KOF und 5-Fluoruracil (5-FU) 600-1000 mg/ m² KOF an den Tagen 1-5 und 29-33.

2.2 Orale Mukositis als akute Strahlennebenwirkung

2.2.1 Klinisches Bild

Die Radiotherapie spielt in vielen Therapiekonzepten für Kopf-Hals-Karzinome eine essentielle Rolle. In der Radioonkologie zählt die Radiotherapie von Kopf-Hals-Karzinomen zu den Behandlungen mit einer hohen Toxizität. Die akute orale Mukositis stellt dabei eine der wichtigen akuten radiogenen Nebenwirkungen dar.

Während einer Radiotherapie bei Kopf-Hals-Karzinomen leiden nahezu alle Patienten unter Schmerzen und Brennen im Mund sowie beim Schluckakt durch mehr oder weniger ausgeprägte makroskopische Veränderungen der Mundschleimhaut wie Erythemen, Pseudomembranen, Ulzerationen oder Nekrosen.

Oft bedingt die orale Mukositis während der Radiotherapie eine Ernährungsumstellung auf flüssige, parenterale oder künstliche enterale Kost per perkutaner endoskopischer Gastrostomie-Sonde. In 16 % (Trotti A et al., 2003) bis 37 % (Murphy BA et al., 2009) der Fälle ist eine Hospitalisierung des Patienten zur Schmerztherapie und Ernährung notwendig. Somit führt die starke Ausprägung der oralen Mukositis zu Therapiemodifikationen und -unterbrechungen, die die Behandlung verlängern und zu schlechteren lokalen Tumorkontroll- und Überlebensraten führen (Russo G et al., 2008).

Dabei ist das Risiko für die Entstehung sowie die Ausprägung der oralen Mukositis und die Zeit bis zum Auftreten der maximalen Mukositis (6. Woche) für Patienten mit Oropharynx-, Larynx- und Hypopharynxkarzinomen äquivalent (Elting LS et al., 2008).

In Untersuchungen zeigten sich durchschnittlich bereits vor Erreichen einer kumulativen Dosis der Mundschleimhaut von 32 Gy bei standardisierter fraktionierter Therapie Erytheme in der Mundschleimhaut. Im späteren Verlauf der Therapie können Ulzerationen auftreten, die je nach Ausprägung als zusammenfließende Ulzerationen, oder im schlimmsten Fall auch als Nekrosen, vorhanden sein können (Narayan S et al., 2008).

2.2.2 Pathophysiologie

Die Mundschleimhaut gehört zu den früh reagierenden Normalgeweben, die sich durch eine hierarchische Organisation der Zellteilung auszeichnen. Von Stammzellen im Organ ausgehend werden in einem Gleichgewicht Funktionszellen proliferiert. Die radiogene orale Mukositis entsteht durch einen Verlust an funktionstüchtigen Zellen im Zuge einer direkten und indirekten Schädigung der Desoxyribonukleinsäure (DNS) der Stammzellen. Diese akute radiogene Mukositis ist in der Regel reversibel.

Die Erforschung der Pathophysiologie der oralen Mukositis ist von großem Interesse, um aus den Ergebnissen eine effektive Prophylaxe und Therapie für die Praxis abzuleiten.

Die komplexen pathophysiologischen Abläufe im Epithel und Submukosa der Mundschleimhaut können in fünf Phasen eingeteilt werden. Im ersten Schritt der Initiierung entstehen durch die ionisierende Strahlung direkte Schäden der DNS, wie DNS-DSB oder -Einzelstrangbrüche sowie Basenschäden und hochreaktive Sauerstoffmoleküle, die eine indirekte Schädigung bewirken. Diese indirekte Schädigung ist charakterisiert durch eine Initiierung einer Kaskade an inflammatorischen Reaktionen. Im zweiten Schritt erfolgt die Bildung und Hochregulation von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. Tumornekrose Faktor α , Interleukin-1- β , Interleukin-6) und verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie dem nuclear factor- κ B (NF- κ B), der die Modulation der DNS Schadensreparatur beeinflusst und proapoptotisch wirkt. NF- κ B wird in epithelialen, endothelialen und mesothelialen Zellen sowie Makrophagen gebildet und aktiviert über die Amplifikation von proinflammatorischen Zytokinen und Mediatoren wie die Cyclooxygenase-2 weitere Signalwege im dritten Schritt. Diese Zytokine und Mediatoren wiederum verstärken über einen positiven Feedbackmechanismus die inflammatorische Reaktion und führen zur Schädigung oder Untergang der Zelle. Bis zu diesem Stadium resultieren für den Patienten nur wenige Symptome, die sich im vierten Stadium der Ulzeration durch zunehmende Schmerzen aufgrund des Verlusts der Barrierefunktion der Schleimhaut und Infiltration des Epithels mit Makrophagen, Mastzellen und Plasma manifestieren. Es kommt zur Ausbildung von Erythemen, Pseudomembranen, Ulzerationen oder Nekrosen. Die sogenannten Pseudomembranen stellen fibrinbelegte Exudate mit Bakterienansammlungen auf den Ulzerationen dar. Nach Beendigung der

Einleitung

strahlentherapeutischen Behandlung kommt es innerhalb von zwei bis drei Wochen durch Proliferation, Migration und Differenzierung der Zellen der Wundränder zur letzten und somit fünften Phase der Heilung (Sonis ST, 2004).

2.2.3 Therapie

Aus dem oben dargestellten Verständnis des komplexen und dynamischen Prozesses der oralen Mukositisentstehung resultierten Therapieforschungen, die vor allem in der Unterbrechung der inflammatorischen Reaktionskaskade und Stimulierung der Zellproliferation ihren Angriffspunkt haben. Der rekombinante Keratinozyten Wachstumsfaktor Palifermin wurde als Meilenstein in der Therapieforschung angesehen. Seine klinische Bedeutung in Hinsicht auf die Reduktion der radiogenen oralen Mukositis ist aktuell noch unklar (Brizel DM et al., 2008).

Zur Zeit gibt es keine Substanz, die eine strahleninduzierte orale Mukositis verhindern kann. Es besteht auch kein durchgreifend neuer Ansatz zur Therapie oder Prophylaxe (Rosenthal DI und Trotti A, 2009). Vielmehr besteht das Therapieziel in der Linderung der eingetretenen Beschwerden unter Radiotherapie. In der Behandlung der Mukositis induzierten Schmerzen haben sich unterschiedlich zusammengesetzte Mundspülungen und Schmerzmittelgaben bewährt (Wong PC et al., 2006). Diesbezüglich existieren wenig aussagekräftige Studien, die konkreten Substanzen einen deutlichen Vorteil in der Supportivtherapie der radiogenen oralen Mukositis zusprechen (Keefe DM et al., 2007).

2.2.4 Einflussfaktoren

Der interindividuelle Unterschied der Ausprägung einer akuten oralen Mukositis ist multifaktoriell bedingt und wird durch verschiedene extrinsische und intrinsische Faktoren beeinflusst.

Die extrinsischen Einflüsse setzen sich zum einen aus therapiebezogenen Faktoren und zum anderen aus patientenbezogenen Faktoren zusammen.

Einleitung

Therapiebezogene Faktoren wie die applizierte Gesamtdosis, die Strahlenart, die Feldgröße, das Fraktionierungsschema (Bentzen SM et al., 2001), die Bestrahlungstechnik (Graff P et al., 2007) und eine kombinierte Chemotherapie (Bernier J et al., 2004) können die Ausprägung der oralen Mukositis beeinflussen. Bei einer simultanen Chemotherapie sind neben dem Pharmakon selbst zusätzlich die Dosis, die Applikationsart (Rades D et al., 2010) und Polymorphismen in den abbauenden Enzymen (Ulrich CM et al., 2001) zu beachten, da sie das schleimhautschädigende Potential der Therapie verstärken können. 5-FU sowie Cisplatin stellen beide Mukositis induzierende Substanzen dar (Rades D et al., 2010; Logan RM et al., 2009). 5-FU trägt vor allem durch eine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine und der NF- κ B Expression zur Entstehung einer oralen Mukositis während der Radiotherapie bei (Logan RM et al., 2009).

Aber auch patientenbezogene Faktoren wie ein fortgeschrittenes Alter der Patienten (Balducci L und Extermann M, 2000), Kofaktoren wie Rauchen (Rugg T et al., 1990; Zevallos JP et al., 2009), eine Neutropenie (Saadeh CE, 2005) und unzureichende Mundhygiene (Barasch A und Peterson DE, 2003) fördern die Entstehung einer oralen Mukositis.

Als intrinsischer Faktor für die Ausbildung von akuten radiogenen Mukositiden ist die individuelle Radiosensitivität zu nennen. Unter diesem Begriff versteht man das jedem Menschen genetisch vorgegebene Potential durch ionisierende Strahlung entstandene Schäden im Genom zu erkennen und zu reparieren. Dabei ist einer der folgenschwersten Schäden der DNS-DSB. Bei dessen Reparatur sind vorrangig DNS-Reparaturenzyme, aber auch das Zellmilieu und Zytokine beteiligt, die durch individuelle Unterschiede in ihrer Ausprägung und Aktivität einen Einfluss auf die DSB-Reparatur ausüben.

2.3 Doppelstrangbrüche

2.3.1 DSB-Reparatur

Nicht oder nur unvollständig reparierte DSB können zu Zellveränderungen, Karzinomentstehung oder Zelltod führen.

Dabei macht sich die Strahlentherapie die insuffiziente Reparatur von DNS-Schäden der Tumorzellen für die Tumorthherapie zu Nutze. In Normalgeweben stellt die DSB-Reparatur einen essentiellen Faktor zur DNS-Stabilität im Hinblick auf die Ausbildung von akuten und späten Nebenwirkungen dar.

Die Reparatur von DSB wird durch zwei Mechanismen organisiert, dem Nicht-homologen End-Joining (NHEJ) und der homologen Rekombination (HR). Beide Mechanismen stehen bezüglich ihrer vielschichtigen und hochkomplexen Vorgänge weiterhin unter intensiver Erforschung.

Die HR, die nur in der späten S-Phase oder G2-Phase möglich ist, benutzt zur Reparatur die Sequenz des Schwesterchromatids als Matrize. Beim NHEJ werden die freien DNS-Enden des DSB nach Entfernung der beschädigten Nukleotide verknüpft, was somit fehlerbehaftet sein kann. Das NHEJ stellt den häufigsten Reparaturmechanismus für DSB in menschlichen Zellen dar, der vorrangig bei Zellen in der G1-Phase beschränkt wird.

Beim NHEJ ist das Heterodimer KU70/80, das aus den zwei Untergruppen Ku 70 und Ku 80 besteht, im ersten Schritt der Erkennung eines DSB beteiligt. Die Ku Proteine binden direkt an die Bruchenden des DSB und halten diese zusammen (Downs JA und Jackson SP, 2004). Zusätzlich bilden sie zusammen mit der DNS abhängigen Proteinkinase (DNA PK) das Holoenzym DNA PK, das die offenen Enden der DNS schützt und weitere Enzyme zur Prozessur der Bruchenden rekrutiert, was unter anderem das Entfernen von nicht ligierbaren Endgruppen bedeutet. Strahleninduzierte DSB sind sehr variabel und erfordern je nach Komplexität unterschiedliche Kombinationen an Enzymen zur Prozessur der Bruchenden. Hierzu gehören z.B. die Endonuklease Artemis, DNA Polymerase μ und λ , Polynukleotidkinase, Aprataxin und PNK ähnlicher Faktor sowie Werner's syndrome protein (Mahaney BL et al., 2009). 10 % der strahleninduzierten DSB benötigen zur Reparatur durch das NHEJ die Endonukleaseaktivität des Proteins Artemis, das

Einleitung

durch das Holoenzym DNA PK oder die Ataxia telangiectasia mutierte Kinase (ATM) phosphoryliert werden kann (Riballo E et al., 2004).

Der letzte Schritt der Reparatur stellt die Ligation der DNS-Enden durch den Ligase IV/XRCC4 Komplex in Anwesenheit der Ku Proteine dar (Nick McElhinny SA et al., 2000).

Zusätzlich erfolgt die Erkennung des initialen DNS-Schadens durch die Proteinkinase ATM mittels Chromatinänderung. Die inaktiv als Dimer vorliegende Kinase wird im aktiven Zustand zu zwei autophosphorylierten Monomeren, die weitere Mediatorproteine der DNS-Reparatur und der Zellzykluskontrolle aktivieren (Bakkenist CJ und Kastan MB, 2003; Shiloh Y, 2003).

Die Interaktion von ATM mit dem Rad 50/Mre11/NBS1 Komplex stellt einen wesentlichen Bestandteil zur Einleitung der HR, der Zellzykluskontrolle und der Verstärkung der ATM Aktivität dar (Horejsí Z et al., 2004; Uziel T et al., 2003; Yuan J und Chen J, 2009). Die Phosphorylierung des Proteins Nijmegen breakage syndrome 1 (NBS1) durch ATM bewirkt wesentliche Reaktionskaskaden zum Ablauf der HR (Tsuchi H et al., 2002a; Kobayashi J et al., 2008). NBS1 stellt auch zusätzlich eine Verbindung zur Rekrutierung von Mediatoren der Zellzykluskontrolle dar (Lim DS et al., 2000; Shiloh Y, 2003).

2.3.2 Veränderung des Chromatins an einem DSB

Rogakou et al. zeigten in bestrahlten Fibroblastenzellkulturen und Mäusen mittels Gelelektrophorese, dass in der Nähe der Bruchstelle eines DSB H2AX, eine ubiquitär im Chromatin vorhandene Histonuntergruppe der H2A-Familie, seine Konfiguration ändert (Rogakou EP et al., 1998).

Diese Histonuntergruppe H2AX, die ungefähr 2-25 % der H2A-Familie darstellt, besitzt ein einzigartiges verändertes und verlängertes Carboxylende mit einer Sequenz aus Serin (Mannironi C, 1989). Bei einem entstandenen DSB wird die Histonuntergruppe innerhalb von Sekunden an Serin 139 in einer Ausdehnung von mehreren Megabasenpaaren phosphoryliert (Rogakou EP et al., 1998). Diese phosphorylierten H2AX werden γ H2AX genannt.

Die Phosphorylierung der H2AX wird durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase ähnliche Kinasen (PIKK), DNA PK (Stiff T et al., 2004), ATM (Burma S et al., 2001) und

Einleitung

ATM- and RAD3 related kinases (ATR) katalysiert (Stiff T et al., 2006; Ward IM und Chen J, 2001). Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1) stellt einen der wichtigsten Faktoren für die Erkennung der γ H2AX-Moleküle dar (Stewart GS et al., 2003; Stucki M et al., 2005). MDC1 amplifiziert die ATM-assoziierte DNS-Schadensantwort und stimuliert sowie stabilisiert über einen positiven Feedbackmechanismus die Entstehung der γ H2AX (Stucki M et al., 2005).

Die phosphorylierten Histone spielen eine elementare Rolle bei der DNS-Schadensantwort und stellen eine Plattform für viele Reparatur- und Zellzykluskontrollproteine dar. Zusätzlich erleichtern sie durch Chromatinkonfigurationsänderung den Zugang für Reparaturproteine und Zellzykluskontrollproteine (Keogh MC et al., 2006).

Für die Reparaturwege NHEJ oder HR sind γ H2AX nicht essentiell, treten aber als Modulatoren der Reparatureffizienz auf (Bassing CH et al., 2002; Celeste A et al., 2003). Bei Unfähigkeit γ H2AX zu bilden ergeben sich Defizite der DNS-Reparatur und eine erhöhte Radiosensitivität (Celeste A et al., 2002).

Für die Aufrechterhaltung der Zellzykluskontrollpunkte sind γ H2AX mitverantwortlich. Wichtige Zellzykluskontrollproteine werden über Microcephalin 1 (MCPH1) und MDC1 durch die Phosphorylierung von H2AX beeinflusst (Chaplet M et al., 2006; Wood JL et al., 2007). Zusätzlich wird γ H2AX eine Rolle bei der Apoptose von Zellen mit unreparierten DNS-Schäden zugeschrieben (Mukherjee B et al., 2006).

Die Reparaturkaskade wird über die Dephosphorylierung der γ H2AX durch die Komplexe der Proteinphosphatasen 2A, 2C und 4 beendet (Chowdhury D et al., 2005; Kimura H et al., 2006; Nakada S et al., 2008).

Die Formierung von γ H2AX ist eine universelle zelluläre Antwort auf DSB. Außer ionisierender Strahlung generieren noch andere exogene Faktoren γ H2AX durch DSB, wie z. B. einige Chemikalien (Banáth JP und Olive PL, 2003), Hitze (Takahashi A et al., 2004) und ultraviolettes Licht (Ward IM und Chen J, 2001). Auch durch Meiose (Hunter N, 2001), Apoptose (Rogakou EP et al., 2000), VDJ Rekombination (Chen HT et al., 2000), class switch Rekombination (Petersen S et al., 2001), freie Telomerenden (Takai H et al., 2003) und Alterungsprozesse (Sedelnikova OA et al., 2004) entstehen phosphorylierte H2AX Histone.

2.3.3 Nachweis von DSB mittels γ H2AX

Seit ihrer Entdeckung fungieren γ H2AX in Studien als Indikator für vorhandene DNS-DSB.

Einen praktikablen Ansatz zum in vitro oder in vivo Nachweis von γ H2AX stellt die Immunfluoreszenzmethode dar (Rogakou EP et al., 1999). Löbrich et al. begründeten die in vivo Anwendung der Immunfluoreszenzmethode zur Detektion von DSB in Blutlymphozyten (Löbrich M et al., 2005). Mittels Antikörper und Fluorochromen können γ H2AX detektiert werden und als Foci mit einer ungefähren Größe von $0,2 \mu\text{m}^2$ innerhalb von Fibroblastenkernen sichtbar gemacht werden (Costes SV et al., 2006). Dabei besteht ein quantitativer Zusammenhang zwischen der Anzahl der γ H2AX-Foci und der Anzahl der DSB (Rogakou EP et al., 1999; Rothkamm K und Löbrich M 2003; Sedelnikova OA et al., 2002).

Das Abnehmen der γ H2AX-Foci, in verschiedenen Methoden wie der Durchflusszytometrie und Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) getestet, entspricht dem Verschwinden der DSB und somit deren Reparatur (Banáth JP et al., 2004; Kühne M et al., 2004; Löbrich M et al., 2005; Mirzayans R et al., 2006; Rothkamm K und Löbrich M, 2003). Zusätzlich korreliert die Kinetik mit der Radiosensitivität (Banáth JP et al., 2004; Kühne M et al., 2004; MacPhail et al., 2003). Die Anzahl der γ H2AX-Foci sowie die Kinetik der Abnahme werden beeinflusst durch die verwendete Bestrahlungsart, -dosis und -energie (Beels L et al., 2010).

Bei gleichen Bedingungen kann die Kinetik der γ H2AX-Foci zum interindividuellen Vergleich eingesetzt werden. Rube et al. zeigten identische Reparaturkinetiken der γ H2AX-Foci für verschiedene Gewebe eines Individuums auf (Rube CE et al., 2008b). Somit kann man die γ H2AX-Foci Reparaturkinetik von peripheren Blutlymphozyten der in Normalgeweben gleichsetzen.

2.4 Radiosensitivität

2.4.1 Erkrankungen mit eingeschränkter DSB-Reparatur

Genetische Defekte in Enzymen der DSB-Reparaturwege verursachen bei betroffenen Patienten elementare Veränderungen der DNS.

Ataxia telangiectasia (AT) und Nijmegen breakage Syndrom (NBS) sind bekannte Beispiele für Erkrankungen der DSB-Reparatur. Bei AT ist die ATM Proteinkinase mutiert, die als Dreh- und Angelpunkt der DSB-Schadensantwort gilt (Savitsky K et al., 1995). Die Inzidenz wird auf 1:40.000 in den USA mit einer Prävalenz von heterozygoten Trägern unterschiedlichster Mutationen des ATM Gens von 1:100 geschätzt (Chun HH und Gatti RA, 2004; Swift M et al., 1986).

NBS-Patienten weisen eine Mutation im NBS1 Protein, einem Modulator der ATM Proteinkinase, auf (Tauchi H et al., 2002b).

Die beiden autosomal-rezessiv vererbten Erkrankungen zeichnen sich durch eine gesteigerte Radiosensitivität, chromosomale Instabilität und eine erhöhte Rate an Malignomen aus. Im Gegensatz zu Patienten mit NBS liegen bei ATM Patienten charakteristisch zusätzlich eine progressive Ataxie durch Verlust der Purkinjezellen der Kleinhirnrinde, Teleangiektasien und ein Immundefekt vor. NBS-Patienten weisen häufig eine Mikrozephalie und mentale Retardierung auf.

Ionisierende Strahlung stellt für Patienten mit diesen Gendefekten der DSB-Reparaturkaskade eine Bedrohung der DNS-Stabilität dar. Wenn eine Radiotherapie unumgänglich ist, tolerieren Patienten mit ATM oder NBS die Radiotherapie schlecht und reagieren regelmäßig mit außergewöhnlich starken Strahlennebenwirkungen, die auch letal enden können (Distel L et al., 2003; Gatti RA, 2001; Gotoff SP et al., 1967). Zusätzlich weisen auch die heterozygoten Träger des AT-Gens, die ungefähr 1% ausmachen, eine schlechtere Verträglichkeit der Strahlentherapie mit Ausbildung von stark ausgeprägten Normalgewebsreaktionen auf, bei in der Regel unauffälligem Phänotyp (Andreassen CN et al., 2006; Ho AY et al., 2007; Iannuzzi CM et al., 2002).

Es ist möglich homozygote oder heterozygote Patienten dieser Erkrankungen, aber auch Patienten mit anderen genetisch bekannten Reparaturdefekten in molekulargenetischen Tests nachzuweisen (Distel L et al., 2003; Kühne M et al., 2004; Rube CE et al., 2008a).

2.4.2 Strahlensensible Patienten

In Studien wird die Rate strahlensensibler Patienten mit bis zu 10 % angegeben (Oppitz U et al., 1999; Sprung CN et al., 2005). Diese Zahl lässt sich aber alleine durch Patienten mit klinisch apparenten Erkrankungen der z.B. in Kapitel 2.4.1. genannten DSB-Reparatur nicht erklären.

Neben den bekannten genetischen Defekten der DSB-Reparaturproteine kann eine DNS-Instabilität durch eine Kombination aus verschiedenen genetischen Veränderungen der DNS-Schadenserkennungs- und Reparaturproteinen entstehen und für eine erhöhte Radiosensitivität verantwortlich sein (Cornetta T et al., 2006; Hendry JH, 2001; Wilson PF et al, 2009). Einzelnukleotid-Polymorphismen sind z.B. für 90 % der Variation des menschlichen Genoms verantwortlich und können, wenn sie in Reparaturgenen vorkommen, ein erhöhtes Risiko verstärkter radiogener Nebenwirkungen bei zuvor asymptomatischen Patienten nach sich ziehen (Andreassen CN et al., 2002; Andreassen CN et al., 2003).

In der Literatur werden mehrfach Patienten beschrieben, die mit starken Nebenwirkungen auf eine Radiotherapie reagieren, ohne an einer definierten genetischen Erkrankung zu leiden (Badie C et al., 1995; Löbrich M et al., 2005; Plowman PN et al.1990; Rube CE et al., 2010a; Woods WG et al., 1988). Es wäre von Nutzen Patienten mit individuell erhöhter Radiosensitivität schon vor der Therapie durch einen prädiktiven Test zu identifizieren.

Die Bestimmung der DSB-Reparatur mittels γ H2AX-Foci in Blutlymphozyten will als Marker der individuellen intrinsischen Radiosensitivität nach strahlentherapeutischer Behandlung zur Erkennung von strahlensensiblen Patienten beitragen.

2.5 Prädiktive Tests

Würde der individuellen Radiosensitivität gemäß dem genetischen Risikoprofil des Patienten Rechnung getragen, könnten schwere Strahlennebenwirkungen vermieden und das Bestrahlungsergebnis durch individualisierte Behandlungen verbessert werden.

Diesbezüglich ist die Forschung im Begriff die verschiedenartigen genetischen Variationen und Veränderungen, die zu einer erhöhten Radiosensitivität führen können, weiter zu analysieren.

Nationale und internationale Projekte, vor allem in Japan und im Vereinigten Königreich, forschen über die genetische Disposition für Radiosensitivität in Tumor- und Normalgeweben (Iwakawa M et al., 2002; West CML et al., 2005). Die Europäische Gesellschaft für Therapeutische Radiologie und Onkologie (ESTRO) setzt sich mit dem übernationalen Projekt „Genetic Pathways for the Prediction of the Effects of Irradiation“, genannt GENEPI, für die Erstellung von Gewebs- und Datenbanken zu Normalgewebsreaktionen ein, um die Reparaturwege der strahleninduzierten Schäden sowie die genetischen Faktoren der Strahlennebenwirkungen aufzuschlüsseln. Das Ziel ist dabei die Erstellung von prädiktiven Tests zur Bestimmung der individuellen Radiosensitivität (Baumann M et al., 2003). Ein weiteres internationales Projekt zur individuellen Optimierung der Radiotherapie stellt das Gene-PARE Projekt (Genetic Predictors of adverse radiotherapy effects) dar, das auf molekularbiologischer Ebene die genetischen Grundlagen der Radiosensitivität untersucht (Ho AY et al., 2006).

Die Erstellung von prädiktiven Tests zur Bestimmung der individuellen Radiosensitivität würde einen bedeutenden Schritt auf dem Weg zur Individualisierung der Radiotherapie in der klinischen Anwendung darstellen.

2.6 Zielsetzung

Um Patienten mit starken akuten strahlenbedingten Nebenwirkungen frühzeitig zu erkennen, versucht die vorliegende Arbeit die individuelle in vivo Reparaturkapazität von DSB in Blutlymphozyten bei Bestrahlungen von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen zu bestimmen und deren Korrelation mit der maximalen Ausprägung der akuten oralen Mukositis zu analysieren.

Diesbezüglich werden folgende Aspekte untersucht:

1. Darstellung der maximalen Mukositisausprägung während der RT
2. Unterschiede in der Ausprägung der oralen Mukositis zwischen den Therapieregimes alleinige RT und RCT
3. Reparaturkinetik der DSB in Lymphozyten nach RT der Kopf-Hals-Region
4. Bedeutung des Einflusses der DSB-Reparatur auf die Ausprägung der oralen Mukositis
5. Unterschiede in der DSB-Reparatur und ihr Einfluss auf die Ausprägung der oralen Mukositis, stratifiziert nach den Therapieregimes RT und RCT

3. Patienten, Material und Methoden

3.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Studie schloss Patienten mit resezierten Kopf-Hals-Karzinomen ein, die nach Beschluss der interdisziplinären Tumorkonferenz eine kurative adjuvante RT beziehungsweise (bzw.) RCT erhielten.

Unter dem Begriff Kopf-Hals-Karzinome wurden in der Studie folgende Tumorlokalisationen zusammengefasst: Mundboden, Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx, Larynx sowie zervikale Lymphknotenmetastasen eines Cancer of Unknown Primary origin Syndrome (CUP-Syndrom). Nasopharynxkarzinome wurden nicht in die Studie aufgenommen.

Eine makroskopisch komplette Tumorentfernung und M0-Stadium waren Voraussetzung zur Aufnahme in die Studie. Als weitere Einschlusskriterien galten ein Karnofsky-Index größer 60 % und ein Alter zwischen 18 und 80 Jahren. Patienten, die Vorbestrahlungen im Tumorgebiet aufwiesen, wurden nicht in die Studie eingeschlossen.

Nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch, in dem Ziele, Ablauf und Risiken der Studie aufgezeigt wurden, und nach erfolgtem schriftlichem Einverständnis zur Studienteilnahme und zu den Blutentnahmen wurden die Patienten in die Studie aufgenommen.

Ein positives Votum der saarländischen Ethikkommission lag vor.

3.2 Therapie

3.2.1 Operation

Die Kopf-Hals-Karzinome wurden nach histologischer Sicherung in einer vorhergegangenen Panendoskopie auf konventionelle oder minimal-invasive Weise in der Hals-Nasen-Ohren-Klinik oder Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des Uniklinikums des Saarlandes reseziert. Große Defekte wurden gegebenenfalls mit funktionellplastischen Rekonstruktionen, z.B. mittels Lappenplastiken versorgt. Je nach Tumorlokalisierung und Tumorausdehnung schloss sich in der gleichen Operationssitzung eine radikale oder selektive Neck dissection der ipsilateralen oder beidseitigen zervikalen Lymphabflusswege an.

3.2.1 Chemotherapie

Nach Indikationsstellung einer Chemotherapie und Abklärung der Chemofähigkeit erhielten die Patienten der RCT-Gruppe in einem stationären Aufenthalt zwei Zyklen Chemotherapie. Diese beinhaltete an den Tagen 1-5 und 29-33 der Radiotherapie täglich eine 24-Stunden Infusion von 5-FU in der Dosierung 600 mg/ m² KOF und eine 30-minütige Applikation von Cisplatin in der Dosierung 20 mg/ m² KOF mit einem Vor- und Nachlauf von insgesamt 2500 ml Ringerlösung sowie einer diuretischen Medikation mittels Mannitol. Begleitend zur Chemotherapie erhielten die Patienten eine Antiemese mit MCP Tropfen (30 Tropfen 1-1-1 p.o.), Dexamethason (8 mg vor Cisplatingabe i.v.) und Ondansetron (8 mg vor Cisplatingabe i.v.).

Die Chemotherapeutika wurden in der Apotheke des Universitätsklinikum des Saarlandes unter aseptischen Bedingungen zeitnah hergestellt.

3.2.2 Radiotherapie

Der Beginn der konventionellen perkutanen Radiotherapie der ehemaligen Tumorregion sowie der lokoregionären zervikalen und supraklavikulären Lymphabflussgebiete war innerhalb von sechs Wochen nach der Operation geplant.

Patienten, Material und Methoden

Zur Reduktion von Komplikationen im Zahn- und Mundbereich wurden vor Beginn der Bestrahlung sanierungsbedürftige Zähne therapiert oder entfernt. Nach der Zahnheilung erfolgte die 3D-konformale computertomographie-gestützte Bestrahlungsplanung.

Die Radiotherapie erfolgte an den Linearbeschleunigern MDX™, MXE™ und ONCOR™ der Firma Siemens in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg. Zur Anwendung kamen Photonen der Grenzenergie 6 MV sowie Elektronen der Grenzenergie 10-12 MeV.

Die Patienten wurden in Rückenlage bei Fixation des Kopfes durch eine individuell angefertigte Kopfmassage aus thermoplastischem Material bestrahlt.

Das Zielvolumen beinhaltete die ehemalige Tumorregion mit mindestens einem Zentimeter Sicherheitssaum sowie die zervikalen und supraklavikulären Lymphabflussregionen beidseits. Die verordnete Gesamtreferenzdosis bei einer R0-Resektion betrug 60 Gy für die ehemalige Tumorregion und die metastatisch befallenen Lymphabflusswege sowie 50 Gy für die nicht metastatisch befallenen Lymphabflussgebiete. Als Einzelreferenzdosis wurden 2 Gy einmal täglich an fünf Tagen der Woche appliziert. Handelte es sich um eine R1-Resektion, wurde die Gesamtreferenzdosis in diesem Bereich auf 66 Gy erhöht. Für das Risikoorgan Rückenmark betrug die Maximaldosis in der Summation 45 Gy.

Zur Radiotherapie wurden zwei verschiedene Techniken je nach Tumorlokalisierung eingesetzt. Für Mundhöhlenkarzinome und Oropharynxkarzinome wurde eine Halbfeldtechnik angewandt. Die Radiotherapie der Hypopharynxkarzinome und Larynxkarzinome, aber auch tiefliegender Zungengrundkarzinome, wurde über zwei laterale Felder mit Tischdrehwinkeln eingestellt. Zur Schonung des Rückenmarks wurden ab einer applizierten Dosis von 30 Gy die dorsalen zervikalen Lymphabflusswege mit einem Elektronenfeld aufgesättigt.

Zum Vergleich der individuellen Bestrahlungsvolumina und zu ihrer Korrelation mit der Anzahl der initial entstandenen DSB wurden in jedem Patientenbestrahlungsplan die Volumina bestimmt, die von der 80 %- sowie von der 50 %-Isodosenlinie (IL) umschlossen wurden. Zusätzlich wurden für die Mundhöhle und den einsehbaren Oropharynx Dosis-Volumen-Histogramme erstellt, um den prozentualen Anteil zu bestimmen, der mit mehr als 30 Gy (V30) und 50 Gy (V50) während der Radiotherapie belastet wurde (siehe Abb. 1). Diese Prozentwerte sollen Aufschluss darü-

Patienten, Material und Methoden

ber geben, in wieweit sich die Dosisbelastung der Mundhöhle auf die Ausprägung der oralen Mukositis auswirkt.

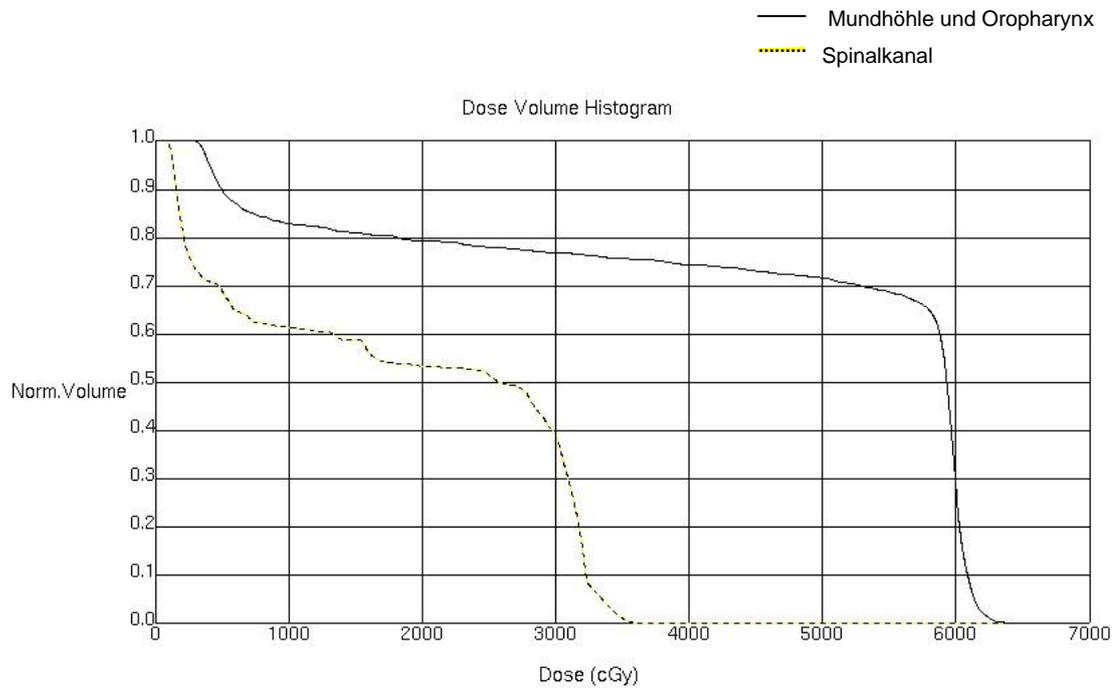


Abbildung 1: Dosis-Volumen-Histogramm

Beispielhaftes Dosis-Volumen-Histogramm zur Bestimmung der V30 und V50 für die Mundhöhle und den einsehbaren Oropharynx. Dokumentation der Spinalkanaldosis gepunktet

3.3 Bestimmung der γ H2AX-Foci

3.3.1 Blutentnahme

Nach Aufklärung und Einwilligung in die Studie wurde den Patienten als Kontrollprobe eine halbe Stunde vor der ersten Bestrahlungsfraction von 2 Gy mittels Kanüle 9 ml Blut aus der Armvene in Heparinröhrchen (NH₄-Heparin-Monovettenröhrchen 9 ml, Sarstedt, Nümbrecht) entnommen.

Bei konstanter Temperatur von $\approx 37^{\circ}\text{C}$ wurde das unbestrahlte Blut mit dem Zellkulturmedium Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (2g/l NaHCO₃, Biochrom Ag, Berlin, Deutschland) im Verhältnis 1:2 verdünnt. Jeweils 3 ml Blut für jeden Zeitpunkt (0,5 h; 2,5 h; 5 h) wurden in 15 ml Zellkulturröhrchen mit 6 ml RPMI vermischt.

Zur Erfassung der strahleninduzierten DSB und ihrer Kinetik wurde den Patienten 3 ml Blut 0,5 h; 2,5 h; 5 h und 24 h nach der ersten Bestrahlungsfraction abgenommen. Dieses in vivo bestrahlte Blut wurde nach dem gleichen Vorgehen wie die Kontrollproben verdünnt und jeweils zusammen mit einer Kontrollprobe zu den jeweiligen Zeitpunkten aufgearbeitet.

3.3.2 Lymphozytenaufbereitung

Zur Isolierung der peripheren Lymphozyten von den übrigen Bestandteilen des Blutes wurden 6 ml des verdünnten Blutes mit 6 ml Lymphozytentrennmedium (Lymphocyte separation medium 1077 light sensitive, PAA Laboratories, Pasching, Deutschland) bei 23°C für 20 Minuten bei 1200 g ohne Bremse zentrifugiert.

Der entstandene Lymphozytenring wurde mit 5 ml PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung mit pH 7,2-7,4 bezogen von der Universitätsapotheke Homburg/Saar) gewaschen, dabei fünfmal über Kopf gemischt und für zehn Minuten bei 23°C mit 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Ein zweiter Waschschrift wurde analog durchgeführt, die Zentrifuge dabei auf 200 g eingestellt.

Das entstandene Pellet wurde nach Dekantieren des Überstandes mit 170 μl PBS resuspendiert. Pro Zeit- und Kontrollpunkt wurden zwei Deckgläser, die mit 0,1 % Gelatine (Typ B from bovine skin) 30 Minuten inkubiert waren, angefertigt. 100 μl

Patienten, Material und Methoden

der Lymphozytensuspension wurden pro Deckglas benötigt. Für die Fixation in Methanol bei -20°C wurden die Deckgläser in 6-Loch-Platten für 30 Minuten inkubiert. Zur Permeabilisierung wurden die Proben für eine Minute in -20°C temperiertem Aceton gebadet.

In mit 4 ml PBS plus Ziegennormalserum (PBS/NS) gefüllten 6-Loch-Platten wurden die Deckgläser auf einem wippenden Plattformschüttler bei 20 rpm zweimal für zehn Minuten gewaschen.

Vor dem Aufbringen des Primärantikörpers wurden die Deckgläser für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 4 ml PBS/NS geblockt.

40 μl des Primärantikörpers (Anti-phospho-Histone H2A.X Ser 139 clone JBW301 mouse monoclonal IgG₁, Upstate, Temecula, USA) wurden in Verdünnung 1:800 mit PBS/NS auf die Deckgläser aufgebracht.

Nach Inkubation in einer feuchten Kammer über Nacht wurden die Deckgläser erneut mit jeweils 4 ml PBS/NS bei Raumtemperatur auf dem wippenden Plattformschüttler gewaschen.

In einer Verdünnung von 1:400 mit PBS/NS wurden 80 μl des fluoreszierenden Sekundärantikörpers (Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) für eine Stunde in einer feuchten Dunkelkammer auf den Objektgläsern inkubiert.

Danach erhielten die Deckgläser weitere vier Waschgänge mit 4 ml PBS für jeweils zehn Minuten.

Im letzten Schritt wurden die Deckgläser mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zur Markierung der DNS und mit je 3 μl Mounting Medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) zum Aushärten auf die Objektträger gesetzt.

Nach der Trocknung und Versiegelung der Deckgläser erfolgte die Auszählung der markierten γH2AX -Foci am Fluoreszenzmikroskop.

3.3.3 Fluoreszenzmikroskopie

Der mit einem Fluorochrom bestückte Sekundärantikörper, der über die Bindung mit dem Primärantikörper γH2AX markiert, absorbiert unter Anregung im Fluoreszenzmikroskop Licht einer Wellenlänge von 495 nm im Absorptionsmaximum. Das Emis-

Patienten, Material und Methoden

sionsmaximum von Licht liegt bei einer Wellenlänge von im Maximum 519 nm (Johnson I und Spence MTZ, 2010). DAPI hat in Verbindung mit DNS ein Absorptionsmaximum von 358 nm und emittiert Licht in einer Wellenlänge von im Maximum 461 nm. Nach Anregung der Proben mit einem definierten UV-Licht Spektrum bedeutet dies, dass die γ H2AX-Foci sich grün und die DAPI gebundene DNS im Zellkern sich blau darstellen.

Mit dem Fluoreszenzmikroskop Eclipse E600 von Nikon wurden nach Erfassung der einzelnen Zellen die angefärbten γ H2AX-Foci in den Lymphozyten ausgezählt. Die Deckgläser wurden in Öl mit einem 60er Objektiv mäanderförmig nach Zellen und γ H2AX-Foci abgesucht. Pro Zeit- und Dosispunkt wurden mindestens 100 Zellen und mindestens 40 γ H2AX-Foci gezählt.

Zusätzlich wurden am Mikroskop digitale Bilder der Proben aufgenommen.

3.4 Dokumentation der oralen Mukositis

Während der sechswöchigen Radiotherapie wurden die Patienten angehalten eine Zahnreinigung nach den Mahlzeiten sowie drei Mal täglich ein Mundspülprogramm mit Panthenol Mundspüllösung und Lutschtabletten, Nystatin/Amphotericin B Suspension und Salbeiteespülungen regelmäßig durchzuführen. Bei Bedarf erhielten die Patienten bei zunehmender oraler Mukositis zusätzlich Lokalanästhetika, nicht-steroidale Antiphlogistika oder Opioide (topisch, p. o., transdermal).

Wöchentlich wurden die Akutstrahlennebenwirkungen im Mundbereich durch eine standardisierte Inspektion der gesamten einsehbaren Schleimhaut der Mundhöhle und des Oropharynx mit Holzspatel und Lichtquelle dokumentiert. Die Mundhöhle und der Oropharynx umfassten die Unter- und Oberlippe, den Mundboden, die seitliche linke und rechte Zunge, die rechte und linke Wange, den harten und weichen Gaumen.

Beurteilt wurden die Art und Weise der Nahrungsaufnahme (fest, flüssig, keine orale Nahrungsaufnahme möglich) und die Ausprägung der Schleimhautveränderung.

Die Unterteilung der Schleimhautveränderungen erfolgte in Erythem und Pseudomembran/Ulzeration.

Bei der wöchentlichen Erfassung des Mukositisgrades nach der WHO-Klassifikation anhand Tabelle 1 war die jeweils am stärksten ausgeprägte Veränderung maßgeblich (WHO handbook for reporting results of cancer treatment, 1979). In die Studienauswertung ging ausschließlich die maximale Ausprägung der oralen Mukositis während der sechswöchigen Radiotherapie ein.

Tabelle 1: Einteilung der oralen Mukositis nach dem WHO Schema von 1979

WHO Grad	Klinisches Bild
0	keine Beschwerden
1	Wundsein bzw. Rötung
2	Ulcera mit oder ohne Erythem, feste Nahrung möglich
3	Ulcera mit oder ohne Erythem, flüssige Nahrung erforderlich
4	Ulcera mit oder ohne Erythem, orale Nahrungsaufnahme nicht möglich

Patienten, Material und Methoden

Zur statistischen Analyse wurden die Patienten anhand ihrer Mukositisausprägung in zwei Gruppen unterteilt. Aufgrund des klinisch bedeutsamen Kriteriums der Einschränkung der oralen Kostzufuhr befindet sich die Trennung der beiden Gruppen bei einer Ausprägung von WHO Grad 3. Patienten, die noch feste Nahrung zu sich nehmen können (WHO Grad ≤ 2), werden im Ergebnisteil der Gruppe der moderat ausgeprägten oralen Mukositis zugeordnet. Patienten, bei denen eine flüssige, parenterale oder enterale Ernährung (WHO Grad ≥ 3) notwendig ist, werden in der Gruppe der höhergradigen Mukositiden zusammengefasst.

3.5 Auswertung

3.5.1 Reparaturparameter

Eine Methode zur Erfassung der Reparaturkapazität stützt sich auf den prozentualen Anteil der reparierten DSB 24 Stunden nach der ersten Bestrahlungsfraction in Bezug zur initialen γ H2AX-Focianzahl nach 30 Minuten (Löbrich M et al., 2005; Menegakis A et al., 2009; Banáth JP et al., 2004). Bildet man den Quotienten aus der Anzahl der γ H2AX-Foci nach 24 Stunden $n(24h)$ und der Anzahl der γ H2AX-Foci nach 30 Minuten $n(0,5h)$ erhält man einen Parameter, der die DSB-Reparaturkapazität anhand von zwei Werten abbildet: RQ24.

$$\mathbf{RQ24} = \frac{n(24h)}{n(0,5h)}$$

Zusätzlich wurden noch zwei weitere Quotienten gebildet, um die Reparatur in den frühen Stunden und in den späteren Stunden innerhalb der ersten 24 Stunden nach erfolgter Radiotherapie aufzuzeigen.

$$\mathbf{RQ2,5} = \frac{n(2,5h)}{n(0,5h)}$$

$$\mathbf{RQ5} = \frac{n(24h)}{n(5h)}$$

3.5.2 Auswertungsprogramme

Alle Tabellen und Diagramme der Arbeit wurden mit Microsoft Office Excel 2007 erstellt.

Bei vorheriger Prüfung der Variablen auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest wurde der t-Test für unabhängige Stichproben in SPSS

Patienten, Material und Methoden

14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0,05$ festgelegt.

Die Bestrahlungspläne und die Berechnung der individuellen Bestrahlungsvolumina sowie die Dosis-Volumen-Histogramme der Mundhöhle und des einsehbaren Oropharynx wurden mit der Bestrahlungsplanungs-Software ADAC Pinnacle 6.0 (ADAC Laboratories, Milpitas, CA) erstellt.

Die Bildbearbeitungsprogramme ImageJ Version 1.38 und Adobe® Photoshop® 7.0 wurden zur Erstellung der Bilder (siehe 4.3.1) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 31 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region in die Studie eingeschlossen, bei denen eine adjuvante RT bzw. eine kombinierte RCT zwischen Januar 2007 und Juni 2008 in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg durchgeführt wurde.

Tabelle 2: Patientenliste

Patient	Geschlecht	Alter	Karnofsky Index	Tumor-lokalisierung	TNM Stadium	Grading	Therapie
1	w	49	90	Mundhöhle	pT2 pN1 cM0	G2	RT
2	m	76	80	Mundhöhle	pT2 pN0 cM0	G2	RT
3	m	49	70	Oropharynx	pT3 pN0 cM0	G2	RT
4	m	54	90	Oropharynx	pT1 pN1 cM0	G2-3	RT
5	m	50	70	Oropharynx	pT3 pN2a cM0	G2	RT
6	m	48	80	Oropharynx	pT2 pN2b cM0	G3	RT
7	w	53	60	Larynx	pT3 pN0 cM0	G2	RT
8	m	50	80	Hypopharynx	pT1 pN2c cM0	G3	RT
9	m	50	70	Oropharynx	pT3 pN1 M0	G3	RT
10	m	60	80	Larynx	pT3 pN0 cM0	G2	RT
11	m	56	80	Oropharynx	pT2 pN2a cM0	G3	RCT
12	m	51	90	Larynx	pT1 pN1 cM0	G2	RT
13	m	68	90	Oropharynx	pT1 pN2a cM0	G2	RT
14	m	50	80	Larynx	pT3 pN2b cM0	G2	RCT
15	m	54	90	Larynx	pT2 pN1 cM0	G3	RCT
16	m	70	70	Oropharynx	pT3 pN0 M0	G3	RT
17	m	67	70	Hypopharynx	pT4 pN2b cM0	G2	RCT
18	m	60	80	Mundhöhle	pT1 pN2b cM0	G2	RCT
19	m	66	90	Mundhöhle	pT4 pN1 cM0	G3	RCT
20	m	44	90	Oropharynx	pT1 pN2a M0	G2	RT
21	m	53	90	Oropharynx	pT1 pN2c M0	G2	RCT
22	m	67	80	Hypopharynx	pT1 pN2b cM0	G2	RCT
23	w	65	80	Oropharynx	pT2 pN2b cM0	G3	RCT
24	m	65	80	Hypopharynx	pT4 pN2b cM0	G2	RCT
25	m	55	80	Oropharynx	pT3 pN2b cM0	G2	RCT
26	m	60	90	Oropharynx	pT2 pN2b cM0	G3	RCT
27	m	59	80	Mundhöhle	pT1 pN0 cM0	G3	RT
28	m	71	90	Larynx	pT2 pN0 cM0	G2	RT
29	m	52	80	Mundhöhle	pT1 pN2c cM0	G2	RCT
30	w	66	90	CUP	cT0 pN2b M0	G3	RCT
31	m	51	80	Oropharynx	pT2 pN2c cM0	G2	RCT

Ergebnisse

Die beiden Patientengruppen (RT n=16, RCT n=15) unterscheiden sich im Tumorstadium, das die Indikation zur Chemotherapie definiert. Somit ist der Therapieablauf der RCT-Gruppe durch einen geplanten stationären Aufenthalt zur Applikation der Chemotherapie in der ersten und fünften Woche der Radiotherapie charakterisiert.

Im Bezug auf Patientenanzahl, Durchschnittsalter, Lokalisation des Tumors sowie mittlere Bestrahlungsvolumina sind die Gruppen balanciert. Zwei Patienten der RT-Gruppe erhielten aufgrund einer R1-Situation 66 Gy.

In der RCT-Gruppe gab es zwei Patienten, die nach einem Zyklus Chemotherapie, die gesamte Therapie wegen zu starken Nebenwirkungen im Bereich der Mundschleimhaut abbrachen. Nach 15 Gy und nach 18 Gy wiesen beide Patienten eine orale Mukositis auf, die einem WHO Grad 3 entsprach. Beide Patienten wurden trotz unvollständig applizierter Radiotherapie in die Ergebnisauswertung aufgenommen und in der Gruppe der stark ausgeprägten oralen Mukositis geführt.

Ein Patient der RCT-Gruppe erhielt ausschließlich Cisplatin in drei Zyklen an Tag 1, 22 und 43 der Bestrahlung in der Dosierung 100 mg/ m² KOF. Zwei Patienten erhielten wegen einer Leukopenie nur einen Zyklus Chemotherapie. Diese drei Patienten behielten in der Auswertung die Zugehörigkeit zur RCT-Gruppe aufgrund der zusätzlichen Toxizität durch die Chemotherapie, auch wenn diese nur unvollständig appliziert wurde.

Ergebnisse

Tabelle 3: Patientenkollektiv

	RT+RCT	RT n (%)	RCT n (%)
Patientenanzahl	31	16	15
Geschlecht			
männlich	27 (87)	14 (88)	13 (87)
weiblich	4 (13)	2(12)	2 (13)
Alter (Jahren)			
Mittelwert	57,7	56,3	59,1
Standardabweichung	8,3	9,8	6,4
Gewicht (kg)			
Mittelwert	71,5	72,3	70,6
Standardabweichung	18,5	16,9	20,8
Größe (cm)			
Mittelwert	174,6	174,3	175
Standardabweichung	7,6	7,3	8,3
Karnofsky Index (%)			
100	0 (0)	0 (0)	0 (0)
90	11 (35)	6 (38)	5 (33)
80	14 (45)	5 (31)	9 (60)
70	6 (20)	5 (31)	1 (7)
Tumorlokalisation			
Mundhöhle	6 (19)	3 (19)	3 (20)
Oropharynx	14 (45)	8 (50)	6 (40)
Hypopharynx	4 (13)	1 (6)	3 (20)
Larynx	6 (19)	4 (25)	2 (13)
CUP	1 (3)	0 (0)	1 (7)
T Stadium			
T0	1 (3)	0 (0)	1 (7)
T1	10 (32)	6 (38)	4 (27)
T2	9 (30)	4 (25)	5 (33)
T3	8 (26)	6 (38)	2 (13)
T4	3 (9)	0 (0)	3 (20)
N Stadium			
N0	7 (23)	7 (44)	0 (0)
N1	6 (20)	4 (25)	2 (13)
N2a	4 (13)	3 (19)	1 (7)
N2b	10 (32)	1 (6)	9 (60)
N2c	4 (13)	1 (6)	3 (20)
N3	0 (0)	0 (0)	0 (0)
UICC Stadium			
Stadium I	1 (3)	1 (6)	0 (0)
Stadium II	2 (6)	2 (13)	0 (0)
Stadium III	9 (30)	8 (50)	1 (7)
Stadium IV A	19 (61)	5 (31)	14 (93)
Stadium IV B	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Stadium IV C	0 (0)	0 (0)	0 (0)

4.2 Orale Mukositis

4.2.1 Ausprägung der oralen Mukositis

Tabelle 4: Mukositisausprägung

WHO Grad	RT+RCT	RCT	RT
0	0	0	0
1	2	0	2
2	11	8	3
3	14	3	11
4	4	4	0

Im Gesamtkollektiv konnten $\approx 42\%$ ($n=13$) der Patienten während der gesamten Radiotherapie feste Nahrung (WHO Grad ≤ 2) zu sich nehmen. Die restlichen $\approx 58\%$ der Patienten ($n=18$) waren zeitweilig, aufgrund der enoralen Beschwerdesymptomatik, während der Therapie auf flüssige, enterale oder parenterale Kost (WHO Grad ≥ 3) angewiesen.

In der Gegenüberstellung der beiden Therapiegruppen weist die RT-Gruppe mehr Patienten mit einer oralen Mukositis WHO Grad ≥ 3 ($n=11$, $\approx 69\%$) auf als die RCT-Gruppe ($n=7$, $\approx 47\%$). Dabei vernachlässigt die vorgenommene Unterteilung des Mukositisgrades in stark (WHO Grad ≥ 3) und schwach (WHO Grad ≤ 2) ausgeprägte orale Mukositis die Verteilung der Minima und Maxima der Mukositisausprägung in den beiden Therapiegruppen. Beide Patienten mit der schwächsten Ausprägung einer oralen Mukositis (WHO Grad 2) gehörten in der vorliegenden Studie der RT-Gruppe an. Im Gegensatz dazu befanden sich alle vier Patienten mit einer oralen Mukositis WHO Grad 4 in der RCT-Gruppe.

Jeder Patient bildete unter Radiotherapie eine orale Mukositis aus, kein Patient hatte eine orale Mukositis WHO Grad 0.

4.2.2 Bestrahtes Volumen

Tabelle 5: Volumen der 50 %- und 80 %-IL

		TB0,5 < 1,0 (Foci/ Zelle)	TB0,5 ≥ 1,0 (Foci/ Zelle)
		MW ± SD	MW ± SD
RT+RCT (n=31)	80 % IL(cm ³)	934 ± 288	1015 ± 250
	50 % IL(cm ³)	2511 ± 663	2624 ± 459
RT (n=16)	80 % IL(cm ³)	950 ± 272	937 ± 278,7
	50 % IL(cm ³)	2574 ± 540	2634 ± 159
RCT (n=15)	80 % IL(cm ³)	914 ± 323	1093 ± 208
	50 % IL(cm ³)	2439 ± 813	2625 ± 656

Die 80 % IL umfasst das Volumen, das mit mindestens 48 Gy bzw. bei einer Gesamtdosis von 66 Gy mit 52,8 Gy belastet wurde. Für die 50 % IL ist ein Wert von 30 Gy bzw. 33 Gy einzusetzen.

Im Gesamtkollektiv erhielten im Durchschnitt 974 cm³ mindestens 48 Gy bzw. 52,8 Gy (entsprechend des 80 %-Isodosenkurvenverlaufs) und 2567 cm³ 30 Gy bzw. 33 Gy (entsprechend des 50 %-Isodosenkurvenverlaufs).

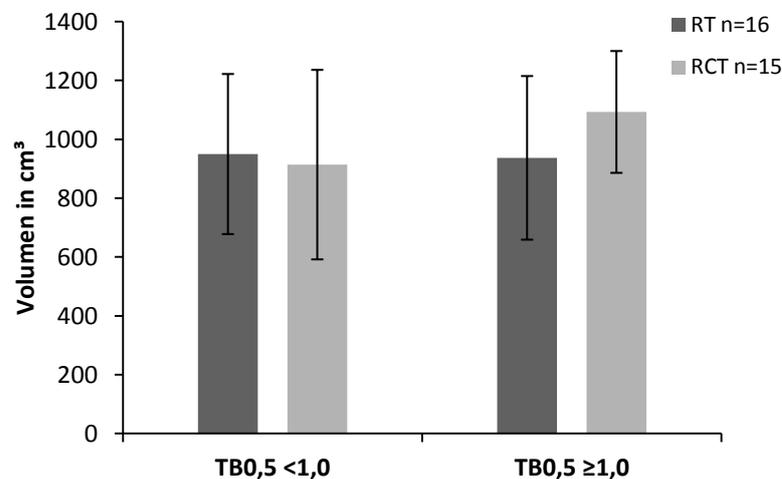


Abbildung 2: Volumen der 80 % IL RT vs. RCT

Volumen, das von der 80 % IL umschlossen ist, und die γ H2AX-Focianzahl nach 30 Minuten (TB0,5) im Vergleich zwischen den beiden Patientengruppen unter Darstellung der Standardabweichung

Bei Patienten der RT-Gruppe wurde ein durchschnittliches Volumen von ≈ 944 cm³ von der 80 % IL umschlossen. Das Volumen von ≈ 1004 cm³ wurde in der RCT-Gruppe mit mehr als 48 Gy bzw. 52,8 Gy belastet.

Ergebnisse

Beim Vergleich der Anzahl an induzierten DSB nach 30 Minuten mit den vorliegenden Volumenmittelwerten ist keine Abhängigkeit festzustellen. Allerdings bilden Patienten der RCT-Gruppe bei größeren bestrahlten Volumina tendenziell mehr DSB aus als bei kleineren Volumina.

Ähnlich verhält es sich in der Darstellung der Volumenbereiche der 50 % IL. Auf die Darstellung der Ergebnisse bezüglich des Verlaufes der 50 % IL wurde deswegen verzichtet.

4.2.3 Dosisbelastung in der Mundhöhle und im Oropharynx

Tabelle 6: Dosisbelastung der Mundhöhle und des einsehbaren Oropharynx

		WHO ≤ 2	WHO ≥ 3
		MW ± SD	MW ± SD
RT+RCT n=31	V30 (%)	82,2 ± 11,2	79,5 ± 14,0
	V50 (%)	73,8 ± 13,5	72,6 ± 16,4
RT n=16	V30 (%)	79,1 ± 17,3	82,3 ± 12,7
	V50 (%)	66,0 ± 17,9	75,8 ± 15,6
RCT n=15	V30 (%)	84,1 ± 6,0	75,1 ± 15,9
	V50 (%)	78,3 ± 7,9	67,7 ± 17,6

Die vorliegende Tabelle zeigt die Dosisbelastung der Mundhöhle bei einer Bestrahlung mit einer Gesamtreferenzdosis von 60 Gy und 66 Gy. Im Gesamtkollektiv wurde im Durchschnitt auf ≈ 73 % der Mundhöhle und des einsehbaren Oropharynx mindestens 50 Gy appliziert. ≈ 81 % der Schleimhaut in diesem Bereich erhielten mindestens 30 Gy.

Insgesamt werden in der RCT-Gruppe 73,0 % der Mundhöhle und des einsehbaren Oropharynx und in der RT-Gruppe 70,9 % mit mehr als 50 Gy belastet. Dabei besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil der Mundhöhle und des Oropharynx, die mit mehr als 50 Gy während der Therapie belastet wurden, und der Mukositisausprägung in beiden Therapiegruppen.

Ergebnisse

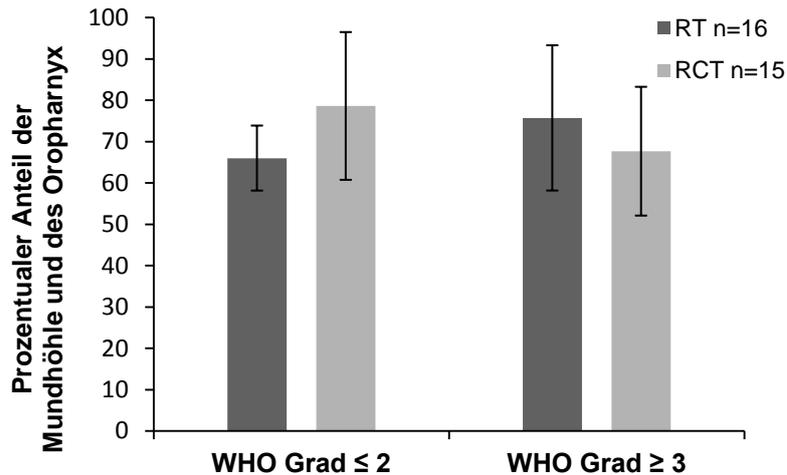


Abbildung 3: Dosisbelastung RT vs. RCT

Darstellung des prozentualen Anteils der Mundhöhle und des einsehbaren Oropharynx der V50 für die beiden Patientengruppen und die Mukositisgruppen unter Darstellung der Standardabweichung

In den beiden Therapiegruppen zeigt sich zwischen Mukositisausprägung und Dosisbelastung der Mundhöhle und Oropharynx eher eine entgegengesetzte Tendenz. Patienten der RT-Gruppe weisen bei größerer prozentualer Dosisbelastung tendenziell eine stärkere orale Mukositis auf, während es sich in der RCT-Gruppe umgekehrt verhält. Die Verteilung der Patienten mit stark und schwach ausgeprägter oraler Mukositis stellt sich wie bereits in 4.2.1. aufgelistet dar: Fünf Patienten der RT-Gruppe und acht Patienten der RCT-Gruppe bilden eine schwache Mukositis WHO Grad ≤ 2 aus; elf Patienten der RT-Gruppe sowie sieben Patienten der RCT-Gruppe eine höhergradige Mukositis WHO Grad ≥ 3 .

Die Ergebnisse aus der Auswertung der Anteile der V50 stimmen mit den Resultaten der V30 überein. Es ist auch hier von keinem relevanten Einfluss der Dosisverteilung in der Mundhöhle auf die Mukositisausprägung auszugehen.

4.3 DSB nach Radiotherapie

Tabelle 7: γ H2AX-Fociwerte im Verlauf RT+RCT, RT, RCT

	TB 0,5	TB 2,5	TB 5	TB 24
	MW \pm SD	MW \pm SD	MW \pm SD	MW \pm SD
RT+RCT (n=31)	0,96 \pm 0,19	0,58 \pm 0,19	0,33 \pm 0,14	0,13 \pm 0,07
RT (n=16)	0,93 \pm 0,21	0,53 \pm 0,21	0,31 \pm 0,14	0,13 \pm 0,07
RCT (n=15)	0,99 \pm 0,17	0,63 \pm 0,14	0,36 \pm 0,14	0,13 \pm 0,08
WHO \leq 2 (n=13)	1,07 \pm 0,15	0,65 \pm 0,15	0,39 \pm 0,14	0,14 \pm 0,08
WHO \geq 3 (n=18)	0,88 \pm 0,18	0,54 \pm 0,20	0,29 \pm 0,13	0,12 \pm 0,06

Tabelle 7 listet die γ H2AX-Fociwerte pro Zelle der vier gemessenen Zeitpunkte mit ihrer Standardabweichung für das gesamte Patientenkollektiv, für beide Therapiegruppen und für die beiden Mukositisgruppen nach Subtraktion der Kontrollprobe auf. Im Folgenden wird in den Unterkapiteln auf die Daten im Detail eingegangen.

4.3.1 Im Gesamtkollektiv

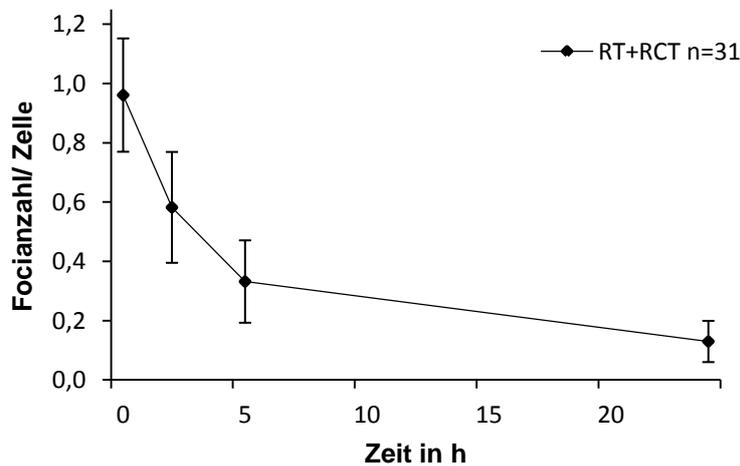


Abbildung 4: γ H2AX-Focianzahl RT+RCT

Mittelwerte für die γ H2AX-Focianzahl/ Zelle je Zeitpunkt im Gesamtkollektiv mit jeweiliger Standardabweichung unter Abzug der Kontrollprobe

30 Minuten nach der Radiotherapie nimmt die γ H2AX-Focianzahl von 0,07 Foci/ Zelle auf 0,96 Foci/ Zelle zu. Nach zweieinhalb Stunden sind noch 60,4 % (0,58 \pm 0,19 Foci/ Zelle) der induzierten DSB messbar, nach fünf Stunden noch 34,4 %

Ergebnisse

($0,33 \pm 0,14$ Foci/ Zelle) und nach 24 Stunden noch 13,5 % ($0,13 \pm 0,07$ Foci/ Zelle). Somit werden in der Zeit bis fünf Stunden 65,6 % und in der Zeit zwischen fünf Stunden und 24 Stunden 20,8 % der initial entstandenen γ H2AX-Foci repariert.

An der vorliegenden Grafik kann man ein Überwiegen einer schnelleren Reparaturphase in den ersten Stunden erkennen.

In der Untersuchung fiel auf, dass kein Patient innerhalb der ersten 24 Stunden nach Radiotherapie die DSB bis zum Ausgangsniveau reparierte. Bei keinem Patienten wurde in den unbestrahlten Kontrollproben ein signifikanter Anstieg der γ H2AX-Focianzahl pro Zelle im zeitlichen Verlauf festgestellt.

Ein Beispiel für die Entstehung von γ H2AX-Foci nach 30 Minuten in Lymphozyten zeigt Abbildung 5, die mit einer an dem Mikroskop integrierten Digitalkamera (Orca, Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) mit Peltier Element bei einem Studienpatienten aufgenommen wurde. Die linke Abbildung zeigt vier Lymphozyten der Kontrollprobe ohne einen Focus. Auf dem rechten Ausschnitt erkennt man einige γ H2AX-Foci 30 Minuten nach der ersten Fraktion von 2 Gy.

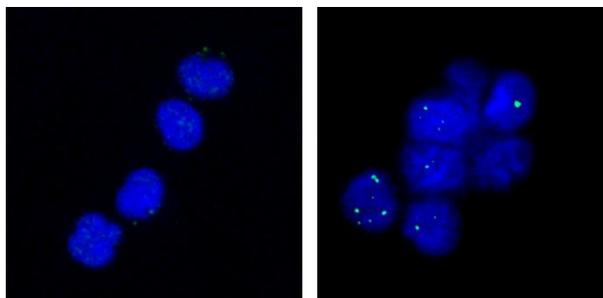


Abbildung 5: Darstellung der γ H2AX-Foci in der Immunfluoreszenz

Lymphozyten, aufgearbeitet nach dem γ H2AX Protokoll, in einer unbestrahlten Blutprobe (links) und 30 Minuten nach einer RT mit 2 Gy bei einem Kopf-Hals-Karzinom Patienten (rechts)

4.3.2 Ermittelte γ H2AX-Fociverteilung im Vergleich

Tabelle 8: Poisson-Verteilung

Auflistung der gezählten γ H2AX-Foci pro Zelle 30 Minuten nach Bestrahlung im Vergleich zur Poisson-Verteilung

Foci/ Zelle	Zellanzahl in der Studie	Zellanzahl nach Poisson
0	3427	1955
1	830	2010
2	525	1033
3	262	354
4	85	91
5	85	19
6	53	3
7	55	1
≥ 8	144	0

Zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von γ H2AX-Foci in einer Zelle kann man sich der Poisson-Verteilung als diskrete Wahrscheinlichkeitsverteilung bei seltenen voneinander unabhängigen zufälligen Ereignissen bedienen.

Die Ergebnisse für die Poisson-Verteilung und die tatsächlich gemessenen γ H2AX-Fociwerte für den 30 Minuten Wert sind in der Tabelle 8 aufgelistet.

Die Mehrzahl der Lymphozyten der Studie ($n= 3427$; 62,7 %) wiesen 30 Minuten nach Bestrahlung keinen Fokus auf. Aufgrund der geringeren Zellanzahl im Bereich der höheren γ H2AX-Foci wurden Zellen mit mehr als acht γ H2AX-Foci zusammengefasst. Das Maximum lag bei 14 γ H2AX-Foci pro Zelle.

Beim Vergleich des erfassten Verteilungsmusters in der vorliegenden Studie mit der Poisson-Verteilung als Näherung einer Wahrscheinlichkeitsverteilung ist eine Diskrepanz zu erkennen. Im Gegensatz zur Poisson-Verteilung kommen in der Untersuchung mehr Zellen mit keinem Fokus und mehr Zellen mit \geq fünf γ H2AX-Foci vor. Die Abweichung von der zu erwartenden γ H2AX-Focianzahl pro Zelle zeigt, dass keine homogene Bestrahlung des gesamten Blutes erfolgte und somit keine zufällige Verteilung der γ H2AX-Foci resultierte. In der Studie kam es aufgrund der Teilkörperbestrahlung unweigerlich zu einer Teilblutbestrahlung, was dieser Vergleich demonstriert.

4.3.3 Beide Patientengruppen im Vergleich

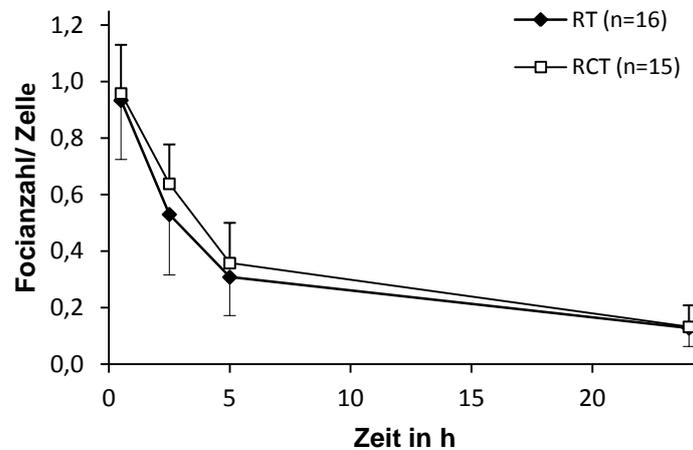


Abbildung 6: γ H2AX-Focianzahl RT vs. RCT

Darstellung der Mittelwerte für die γ H2AX-Focianzahl/ Zelle je Zeitpunkt in der RT-Gruppe und der RCT-Gruppe mit jeweiliger Standardabweichung unter Abzug der Kontrollprobe

In beiden Therapiegruppen wurde bei initial vergleichbaren γ H2AX-Foci nach 30 Minuten innerhalb von 24 Stunden auf eine ähnliche Anzahl an verbliebenen DSB repariert (RT= $0,128 \pm 0,07$ Foci/ Zelle, RCT= $0,132 \pm 0,08$ Foci/ Zelle). Die residualen γ H2AX-Foci nach 24 Stunden entsprechen wie im Gesamtkollektiv nicht dem Ausgangswert vor Bestrahlung.

Im Vergleich der beiden Therapieregimes bezüglich der Anzahl der γ H2AX-Foci pro Lymphozyt und Zeitpunkt repariert die RT-Gruppe in den ersten Stunden tendenziell schneller als Patienten der RCT-Gruppe. Die Patienten der RT-Gruppe weisen nach fünf Stunden noch durchschnittlich 33,3 % der initialen γ H2AX-Foci auf, wohingegen bei Patienten der RCT-Gruppe im Durchschnitt noch 36,4 % der initialen γ H2AX-Foci vorliegen. Ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der γ H2AX-Foci pro Zeitpunkt der beiden Therapiegruppen konnte nicht detektiert werden.

4.3.4 Beide WHO Gruppen im Vergleich

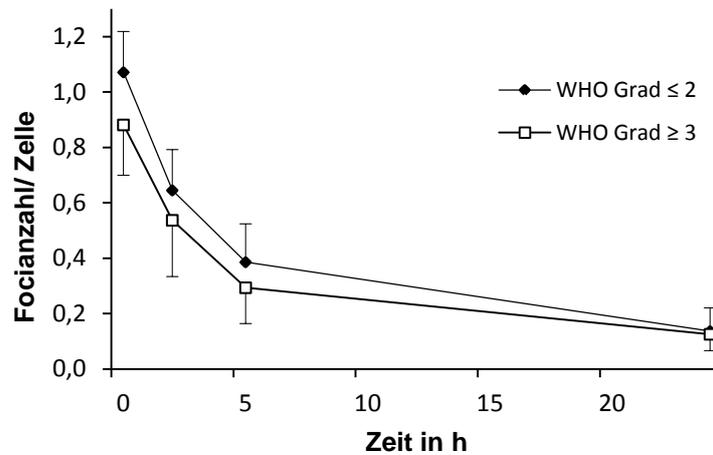


Abbildung 7: γ H2AX-Focianzahl WHO Grad ≤ 2 vs. WHO Grad ≥ 3

Darstellung der Mittelwerte für die γ H2AX-Focianzahl/ Zelle je Zeitpunkt in den beiden WHO Gruppen mit jeweiliger Standardabweichung unter Abzug der Kontrollprobe

In der Darstellung der DSB-Reparatur in Abhängigkeit der Mukositisausprägung zeigt sich tendenziell eine bessere Reparaturfähigkeit der Patienten, die eine schwache orale Mukositis (WHO Grad ≤ 2) ausbilden. Die Gruppe der Patienten mit schwachen Mukositiden startet im Mittel mit $\approx 22\%$ mehr DSB, repariert diese aber auf das gleiche Niveau wie die Patienten mit einer stärker ausgeprägten oralen Mukositis. Wie anhand des Diagramms zu erkennen ist, werden diese vermehrten γ H2AX-Foci bei Patienten der WHO Gruppe \leq Grad 2 innerhalb der letzten 18 Stunden des ersten Tages nach applizierter Strahlung repariert.

4.4 DSB-Reparaturparameter

4.4.1 Verteilung des Reparaturparameters RQ24

Der Parameter RQ24 bildet das Verhältnis der verbliebenen γ H2AX-Foci nach 24 Stunden zur initialen γ H2AX-Focianzahl ab. Je kleiner der RQ24-Wert ist, desto weniger residuale γ H2AX-Foci sind nach 24 Stunden noch vorhanden. In einem Diagramm dargestellt, ergibt sich für die RQ24-Daten die in Abbildung 8 aufgeführte Verteilung mit einem Minimum bei 0,012, einem Maximum bei 0,28 und einem Mittelwert von 0,14. Der Parameter besitzt einen Häufigkeitsgipfel um 0,1. 12 Patienten weisen einen Reparaturquotienten der residualen γ H2AX-Foci nach 24 Stunden zur initialen Focianzahl größer als der Mittelwert auf.

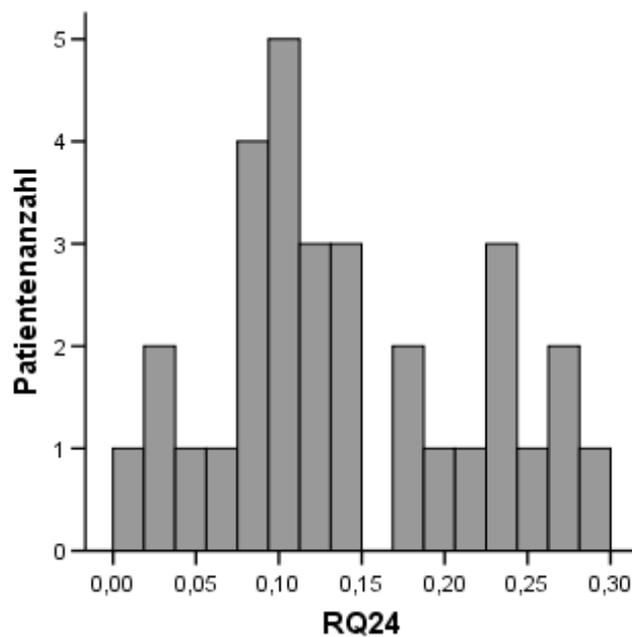


Abbildung 8 : Verteilung RQ24

Darstellung der Verteilung des RQ24 für RT+RCT, n=31, MW=0,14, SD=0,08

4.4.2 Einfluss der Reparatur auf die Mukositisausprägung

Tabelle 9: Kreuztabelle RQ24 RT+RCT

RT+RCT	WHO Grad ≤ 2	WHO Grad ≥ 3	Gesamt
RQ24 < 0,22	11	13	24
RQ24 $\geq 0,22$	2	5	7
n	13	18	31

Im Vergleich der WHO Gruppen mit der Reparaturfähigkeit im Gesamtkollektiv wurden die Patienten bei dem Wert von 0,22 des Reparaturparameters RQ24 in zwei Gruppen unterteilt. Der Wert 0,22 entspricht dabei dem Mittelwert plus eine Standardabweichung (Hoeller U et al., 2003).

Der RQ24 ergibt bei 24 der 31 Patienten einen RQ24 von < 0,22 und bei sieben Patienten einen RQ $\geq 0,22$. In der Gruppe der 24 Patienten mit einem RQ24 < 0,22 ist die Anzahl der stark und schwach ausgeprägten Mukositiden relativ ausgeglichen. Von sieben Patienten mit einem RQ24 $\geq 0,22$ bilden fünf eine stark ausgeprägte orale Mukositis aus. Tendenziell treten somit mehr Mukositiden WHO Grad ≥ 3 in der Gruppe mit einem RQ $\geq 0,22$ auf als in der Gruppe mit einem RQ24 < 0,22.

Unter der Einschränkung der geringen Patientenzahl kann dies in der Analyse der beiden Therapiegruppen RT und RCT wie folgt dargestellt werden:

Tabelle 10: Kreuztabelle RQ24 RT

RT	WHO Grad ≤ 2	WHO Grad ≥ 3	Gesamt
RQ24 < 0,22	5	7	12
RQ24 $\geq 0,22$	0	4	4
n	5	11	16

Tabelle 11: Kreuztabelle RQ24 RCT

RCT	WHO Grad ≤ 2	WHO Grad ≥ 3	Gesamt
RQ24 < 0,22	6	6	12
RQ24 $\geq 0,22$	2	1	3
n	8	7	15

Ergebnisse

Die im Gesamtkollektiv darstellbare Tendenz verdeutlicht sich in der isolierten Betrachtung der beiden Therapiegruppen. Patienten mit einer alleinigen Radiotherapie bilden bei einem $RQ24 \geq 0,22$ ausschließlich stark ausgeprägte Mukositiden aus. Bei Patienten mit einem $RQ24 < 0,22$ ist das Verhältnis zwischen stark und schwach ausgeprägter oraler Mukositis ausgeglichen mit fünf vs. sieben Patienten. Diese Ergebnisse der RT-Gruppe zeigen, dass Patienten auch mit wenig residualen γ H2AX-Foci 24 Stunden nach der ersten Bestrahlungsfraction Mukositiden WHO Grad ≥ 3 ausbilden. Die Möglichkeit der Ausbildung einer höhergradigen akuten Strahlennebenwirkung der Mundschleimhaut ist jedoch mit mehr verbliebenen γ H2AX-Foci nach 24 Stunden höher.

Im Gegensatz dazu zeigen Patienten der RCT-Gruppe bei einem erhöhten RQ24-Wert keine Tendenz der vermehrten Ausbildung einer oralen Mukositis WHO Grad ≥ 3 . Hier ist in den beiden RQ24-Gruppen das Verhältnis zwischen stark und schwach ausgeprägter oraler Mukositis ausgeglichen.

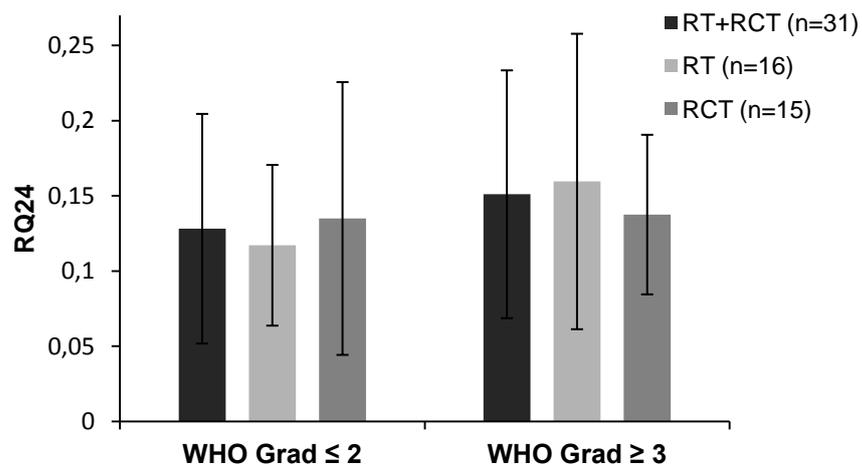


Abbildung 9: RQ24 und Mukositisausprägung RT+RCT, RT, RCT

Mit der Unterteilung in eine schwach und stark ausgeprägte orale Mukositis stellen sich die RQ24 Werte auch graphisch in Abbildung 9 mit dieser oben beschriebenen Tendenz dar ($RQ24_{RT+RCT} = 0,13$ vs. $0,15$). Patienten der RCT-Gruppe weisen im Durchschnitt einen gleichen RQ24 ($RQ24_{RCT} = 0,135$ vs. $0,138$) für beide Mukositisgruppen auf, wohingegen Patienten der RT-Gruppe einen um $\approx 25\%$ höheren RQ24 in der höhergradigen Mukositisgruppe zeigen ($RQ24_{RT} = 0,12$ vs. $0,16$), was sich statistisch als nicht signifikant erwiesen hat.

4.4.3 Reparaturparameter RQ2,5 und RQ5

Die beiden folgenden Parameter repräsentieren Zeitintervalle der Reparatur innerhalb der ersten 24 Stunden nach der ersten Bestrahlungsfraktion. Der Parameter RQ2,5 beschreibt das Verhältnis der γ H2AX-Foci nach zweieinhalb Stunden zu der initialen Focianzahl nach 30 Minuten. Ein weiterer Quotient stellt der RQ5 dar. Er bildet das Verhältnis der residualen γ H2AX-Foci nach 24 Stunden zu der Focianzahl nach fünf Stunden ab.

Je mehr γ H2AX-Foci nach zweieinhalb Stunden noch vorhanden waren, desto größer ist der Zahlenwert des RQ2,5. Ebenso verhält es sich für den Parameter RQ5.

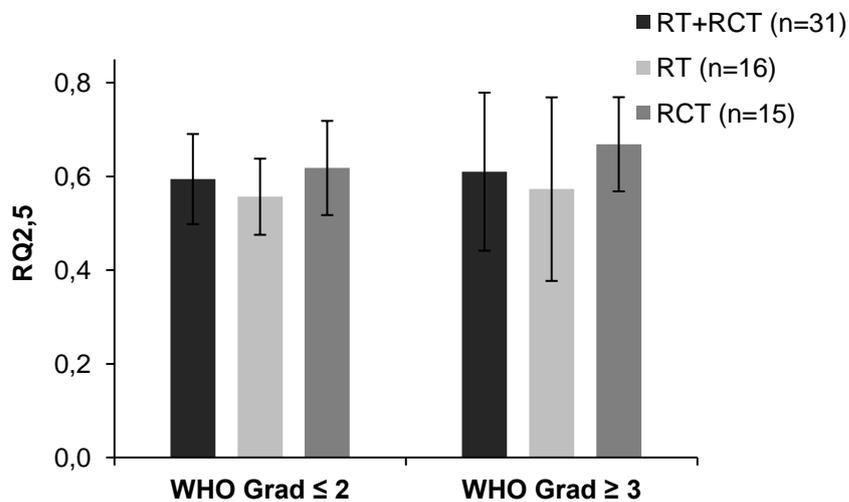


Abbildung 10: RQ2,5 und Mukositisausprägung RT vs. RCT

Zweieinhalb Stunden nach applizierter Strahlung zeigt sich im Gesamtkollektiv, in der RT-Gruppe und in der RCT-Gruppe kein bedeutender Unterschied in den vorhandenen γ H2AX-Foci in Bezug auf die Mukositisausprägung ($RQ2,5_{RT+RCT} = 0,6$ vs. $0,61$; $RQ2,5_{RT} = 0,56$ vs. $0,57$; $RQ2,5_{RCT} = 0,62$ vs. $0,67$).

Ergebnisse

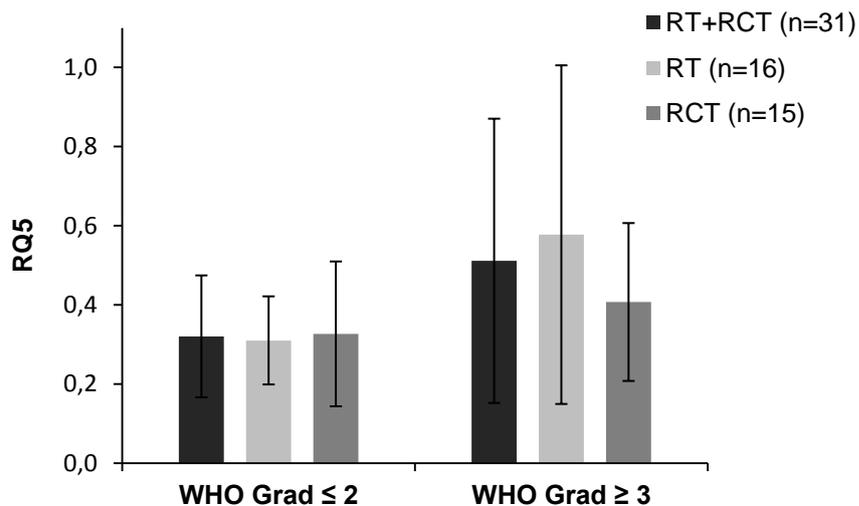


Abbildung 11: RQ5 und Mukositisausprägung RT vs. RCT

Anhand des Diagramms des RQ5 ist die Tendenz zu erkennen, dass Patienten bei- der Therapiegruppen insgesamt bei verhältnismäßig mehr γ H2AX-Foci nach 24 Stunden eine stärker ausgeprägte orale Mukositis aufweisen als Patienten mit einer schwach ausgeprägten oralen Mukositis. Die in 4.4.2. genannte Tendenz des RQ24 kann im RT-Kollektiv statistisch signifikant erwiesen werden. Im Vergleich der The- rapiegruppen ist eine deutliche Abweichung des Fociverhältnisses zwischen fünf und 24 Stunden in der RT-Gruppe zu erkennen. Dort liegt der mittlere RQ5 Wert bei Patienten mit einer stark ausgeprägten Mukositis bei einem RQ5= 0,58 deutlich hö- her als bei Patienten mit einer schwach ausgeprägten oralen Mukositis mit RQ5= 0,31. In der Gegenüberstellung der Mittelwerte des Parameters RQ5 der beiden Mukositis-gruppen in der RT-Gruppe ergibt dies einen p-Wert= 0,029.

Für das Gesamtkollektiv bedeutet ein RQ5 Wert von 0,32 für die WHO Gruppe ≤ 2 und 0,51 für die WHO Gruppe ≥ 3 nur eine Tendenz, die mit einem p-Wert= 0,11 nicht signifikant ist.

Tabelle 12: Kreuztabelle RQ5 RT+RCT

RT+RCT	WHO Grad ≤ 2	WHO Grad ≥ 3	Gesamt
RQ5 < 0,73	15	11	26
RQ5 $\geq 0,73$	0	5	5
n	15	16	31

Ergebnisse

Tabelle 13: Kreuztabelle RQ5 RT

RT	WHO Grad ≤ 2	WHO Grad ≥ 3	Gesamt
RQ5 < 0,73	7	5	12
RQ5 ≥ 0,73	0	4	4
n	7	9	16

Tabelle 14: Kreuztabelle RQ5 RCT

RCT	WHO Grad ≤ 2	WHO Grad ≥ 3	Gesamt
RQ5 < 0,73	8	7	15
RQ5 ≥ 0,73	0	0	0
n	8	7	15

Zur Verdeutlichung dieses Ergebnisses wird die Kreuztabelle für den Parameter RQ5 aufgeführt. Dabei ist zu beachten, dass eine große Standardabweichung sowie eine ausgeprägte Spannweite (Minimum= 0,17 und Maximum= 1,38) vorliegen. Hier wurde der Trennwert analog zu 4.4.2 beim Mittelwert plus die einfache Standardabweichung bei 0,73 gewählt.

In der RT-Gruppe bilden alle Patienten mit einem RQ5 ≥ 0,73 eine orale Mukositis WHO Grad ≥ 3 aus. Die RCT-Gruppe weist keinen Patienten mit einem RQ5 ≥ 0,73 auf. Insgesamt sind bei einem RQ5 < 0,73 Patienten mit Mukositiden beider Eingruppierungen vorhanden.

5. Diskussion

Die durchgeführte Studie untersuchte den Einfluss der individuellen in vivo DSB-Reparatur in Blutlymphozyten auf die Inzidenz einer oralen Mukositis während einer Radiotherapie bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen mit oder ohne simultane Chemotherapie. Erfasst wurden die DSB innerhalb der ersten 24 Stunden nach applizierter Bestrahlung zu vier Zeitpunkten mittels der γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode, die indirekt DSB über die Chromatinveränderung markiert.

Die Auswertung der Daten zeigte keinen signifikanten Unterschied in den beiden Therapiegruppen bezüglich der initial entstandenen γ H2AX-Focianzahl sowie der prozentualen γ H2AX-Foci Reparatur innerhalb der ersten 24 Stunden.

In der Analyse der Mukositisausprägung mittels Reparaturquotienten trat in der RT-Gruppe tendenziell häufiger eine stark ausgeprägte orale Mukositis bei mehr vorhandenen γ H2AX-Foci nach 24 Stunden in Bezug zu den γ H2AX-Foci nach 30 Minuten bzw. fünf Stunden auf. Dieser Einfluss der individuellen DSB-Reparatur auf die Ausprägung der Akutstrahlennebenwirkung war in der RCT-Gruppe nicht vorhanden. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die individuelle DSB-Reparatur gemessen mit dem RQ24 als Einflussfaktor auf die Ausprägung der oralen Mukositis durch eine simultane Chemotherapie an Gewicht verliert.

Eine Beeinflussung der initialen γ H2AX-Focianzahl bzw. Mukositisausprägung durch das Bestrahlungsvolumen bzw. durch die applizierte Dosis auf die Mundschleimhaut konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden.

5.1 Betrachtungen zur Methode

5.1.1 Mukositisdokumentation

Das Beurteilungsschema der oralen Mukositis nach WHO, das in der vorliegenden Studie angewandt wurde, erfasst die morphologischen Veränderungen der Mundschleimhaut sowie die der Nahrungsaufnahme und klassifiziert diese in fünf Gradeinteilungen. Durch seine Struktur eignet sich das WHO Schema zur Einteilung in zwei Mukositis Klassen, wie es für die Auswertung der Studie benötigt wurde.

Bezüglich des Ablaufs der oralen Mukositiserfassung führten Wygoda et al. an, dass bei wöchentlicher Beurteilung die orale Mukositis um 20-36 % geringer bewertet wird als bei einer täglichen Erfassung (Wygoda A et al., 2009). Somit läuft die wöchentlich erfolgte Dokumentation der Mukositisausprägung Gefahr den wellenartigen Verlauf der oralen Mukositis nicht ausreichend zu erfassen.

Im Hinblick auf die extrinsischen Einflussfaktoren der Mukositisausprägung (siehe 2.2.4) wurden die physikalischen therapiebezogenen Daten wie die applizierte Dosis, die Fraktionierung und die bestrahlten Volumina erfasst und stellten sich homogen dar. Demgegenüber ist der Kofaktor Rauchen nur bei einem Teil der Patienten bei Beginn der Radiotherapie registriert worden. Somit ist keine verlässliche Aussage bezüglich dieses Einflussfaktors in der Studie zu treffen. Hinzu kommt, dass Albino et al. das Auslösen von γ H2AX in vitro in menschlichen bronchialen Epithelzellen durch Tabakrauch Exposition nachweisen konnten (Albino AP et al., 2004). Somit ist das Rauchen ein nicht zu vernachlässigender Faktor im Zusammenhang mit der Bildung von γ H2AX. Dies sollte in zukünftigen Studien mitberücksichtigt werden.

5.1.2 Charakteristika der γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode

Die Studie bedient sich der Immunfluoreszenzmethode zur Bestimmung der DSB durch den Marker γ H2AX. Mit der Bestimmung der γ H2AX zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb 24 Stunden nach Radiotherapie wird die individuelle DSB-Reparatur der Patienten ermittelt.

Diskussion

Ein Vorteil der γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode im Gegensatz zu bisherigen Methoden stellt der Nachweis von DSB bereits bei therapeutisch relevanten Strahldosen im Bereich weniger mGy dar (Golfier S et al., 2009; Kuefner MA et al., 2009; Rothkamm K und Löbrich M, 2003; Rothkamm K et al., 2007). Diese sensitive Untersuchungsmethode lässt sich an Blut- sowie Gewebeproben durchführen. Außerdem besteht die Möglichkeit geringe Reparaturfehler mit der vorliegenden Methode in vivo sowie in vitro nachzuweisen (Löbrich M et al., 2005; Rube CE et al., 2008a).

Aufgrund der Proportionalität zwischen applizierter Dosis und entstandenen γ H2AX-Foci kann die Immunfluoreszenzmethode als ein Bestandteil zur Dosisabschätzung bei in vivo Bestrahlungen dienen (Golfier S et al., 2009; Rothkamm K et al., 2007; Sak A et al., 2007).

Die γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode bietet jedoch auch gewisse Limitierungen. Der im Methodenteil beschriebene Ablauf ist untersucherabhängig und zeitintensiv in der Auszählung der γ H2AX-Foci. Außerdem besteht ab mehreren Gy die Schwierigkeit der Unterscheidung der einzelnen γ H2AX-Foci, da diese eng und massenhaft in den Zellen vorliegen. Diesbezüglich wurden in der jüngeren Forschung die automatisierte Zellaufbereitung sowie computer-basierte Bildanalysen mit automatischer γ H2AX-Focierfassung entwickelt, um eine bessere Objektivität und eine größere Untersuchungsmenge zu erzielen (Bhagal N et al., 2009; Turner HC et al., 2011).

5.1.3 Korrelation der γ H2AX-Foci mit DSB

Die Annahme, dass radiogen induzierte DSB die Bildung von γ H2AX auslösen, ist allgemein gültig. Aber die Frage, ob jeder γ H2AX-Focus einem DSB entspricht und jeder DSB zu einem γ H2AX-Focus führt, ist Diskussionsgegenstand aktueller Forschungen.

Insbesondere die residualen γ H2AX-Foci nach 24 Stunden stehen im Diskussionsmittelpunkt, da sie für die Bestimmung der Radiosensitivität mittels Korrelation zum Anfangswert essentiell sind. Banáth et al. führten diesbezüglich kritisch an, dass nicht alle noch vorhandenen γ H2AX-Foci DSB entsprechen. Residuale γ H2AX-Foci ermittelt in der Immunfluoreszenzmethode 24 Stunden nach Bestrahlung zeigten

Diskussion

mehr DSB an, als im Comet Assay nachgewiesen wurde (Banáth JP et al., 2004). Auch mittels Western Blot oder Durchflusszytometrie waren nach 24 Stunden weniger DSB vorhanden als γ H2AX-Foci nach Immunfluoreszenzausarbeitung verblieben waren (Bouquet F et al., 2006; Suzuki M et al., 2006). Als Erklärung der Diskrepanz zwischen vorhandenen γ H2AX-Foci und der tatsächlichen DSB-Anzahl kann die Begrenztheit der genannten Methoden zur Detektion von DSB angeführt werden. Auch wird die Notwendigkeit der Persistenz der Phosphorylierung der Histongruppe für den Ablauf weiterer Reparaturvorgänge bei schon reparierten DSB vermutet (Kinner A et al., 2008). Es ist auch nicht auszuschließen, dass diese verbliebenen phosphorylierten H2AX einen Einfluss auf die Radiosensitivität ausüben.

Die Frage bleibt jedoch unbeantwortet, welche γ H2AX-Foci nach 24 Stunden wirklich unreparierte DSB darstellen und welche lediglich einer veränderten Chromatinstruktur bei bereits reparierten DSB entsprechen.

Eine weitere relevante Einflussgröße zur Bestimmung der Radiosensitivität ist die induzierte Focianzahl nach 30 Minuten. Diesbezüglich weisen die Studien auf eine enge Übereinstimmung zwischen der Anzahl der DSB bestimmt mittels der γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode und anderen Methoden wie die PFGE und Durchflusszytometrie hin (Rogakou EP et al., 1998; Rothkamm K und Löbrich M, 2003). Demgegenüber zeigen Kegel et al. und Rube et al. einen geringeren Wert an induzierten γ H2AX-Foci bestimmt mit der Immunfluoreszenzmethode pro Gy im Vergleich zur Bestimmung mit der PFGE (Kegel P et al., 2007; Rube CE et al., 2008a, 2008b und 2010b). Da Rube et al. die Untersuchungen an Mauszellen durchgeführt haben, wird als eine Erklärung der nicht identischen γ H2AX-Foci Anzahl der unterschiedliche DNS-Gehalt der Mauszellen angeführt. Außerdem sollte eine Überschätzung der DSB durch die PFGE mit berücksichtigt werden. Es kann an hitzelabilen Stellen zur zusätzlichen Entstehung von DSB kommen, ohne dass sie im eigentlichen Sinne radiogen induziert sind (Rydberg B, 2000).

Neue Erkenntnisse bezüglich der Korrelation der γ H2AX-Foci mit DSB zeigen aktuelle Untersuchungen von Rube et al. mittels Transmissionselektronenmikroskop auf. Mit dieser aufwendigen und hochauflösenden Methode wurden γ H2AX zusammen mit dem Heterodimer Ku 70/80, das direkt die offenen DSB-Enden markiert, und dem DSB-Mediatorprotein p53-binding protein 1 (53PB1) nach Be-

Diskussion

strahlungen von Mausgewebe untersucht. 53BP1 sowie γ H2AX-Foci wurden nur in heterochromatinen DNS-Abschnitten nachgewiesen. Mit einer Doppelfärbung konnten keine γ H2AX-Foci im Euchromatin aufgezeigt werden, obwohl Ku70/80 DSB dort belegte (Rübe CE et al., 2011). Ältere Studien beschreiben diesbezüglich entgegengesetzte Verhältnisse. Sie wiesen das gehäufte Vorkommen von γ H2AX-Foci im Euchromatin mit reduzierten γ H2AX-Anteilen im Heterochromatin mittels Anfärbung typischer Chromatinproteine nach (Cowell IG et al., 2007; Karagiannis TC et al., 2007). Hier bleibt anzumerken, dass die aktuelle Weiterentwicklung hin zur Transmissionselektronenmikroskopie demgegenüber eine bessere Einsicht und genaue Beurteilung der Chromatinkonfiguration erlaubt. Eine direkte Markierung eines Proteins der DSB-Reparaturkaskade wie 53BP1 oder Ku70/80 kann zusätzlich eine exaktere Bestimmungen der DSB-Anzahl ermöglichen.

Diese aktuellen Ergebnisse von Rübe et al. werfen durch ihren neuen direkten Ansatz des DSB-Nachweises Zweifel auf, ob die γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode die Gesamtheit aller entstandenen DSB nach Radiotherapie vollständig abbildet. Darüber hinaus wird deutlich, dass γ H2AX nicht einem direkten Korrelat der DSB entsprechen, sondern einen indirekten Marker der weit ausgedehnten Chromatinveränderung an einem DSB darstellen. Die Herausforderung bleibt in zukünftigen Untersuchungen diesen Unterschied weiter herauszustellen und die speziellen Fragen bezüglich der Korrelation zwischen γ H2AX-Foci und DSB zu erforschen.

5.1.4 Einfluss der Chemotherapie

Der Einfluss einer Chemotherapie mit Cisplatin auf die γ H2AX-Foci Entstehung ist nur ansatzweise geklärt. Allgemein bekannt ist die Interaktion des Cisplatins mit der DNS, wobei keine einheitlichen Ergebnisse bezüglich der Auswirkung auf die γ H2AX-Foci Entstehung vorliegen. Frankenberg-Schwager et al. zeigten in Hefen und Säugetierzellen, dass Cisplatin DSB durch „interstrand crosslinks“ an Replikationsgabeln induziert. Diese DSB können als γ H2AX-Foci sichtbar gemacht werden und sind noch bis zu 24 Stunden nach Applikation nachweisbar (Frankenberg-Schwager M et al., 2005). Im Gegensatz dazu berichteten Sak et al. bei paralleler Radiotherapie und Cisplatingabe von einer gleichen Grundanzahl der γ H2AX-Foci in Lymphozyten, die aber nach Cisplatingabe eine bis zu 30 % niedrigere Focianzahl

Diskussion

in vivo und in vitro bis zum vierten Tag nach Applikation bei einer Dosierung von 20-50mg/ m² KOF aufzeigten (Sak A et al., 2007; Sak A et al., 2009).

In unserer Studie ist dieser Effekt nicht auszuschließen, aber durch die vergleichbaren Werte der beiden Therapiegruppen unwahrscheinlich.

5-FU scheint nicht in die Reparaturkaskade der DSB einzugreifen bzw. die Entstehung oder das Verschwinden der γ H2AX zu verändern (Wyatt MD und Wilson DM, 2009).

5.2 Beurteilung der Ergebnisse

5.2.1 Verteilung der Mukositisausprägung

Die Studie untersucht die regelmäßig im Verlauf einer Radiotherapie der Kopf-Hals-Region auftretende akute orale Mukositis als Phänotyp der Radiosensitivität im Zusammenhang mit der DSB-Reparatur.

In der vorliegenden Untersuchung entwickelte jeder Patient während der Behandlung eine orale Mukositis. Der Therapieabbruch bei zwei der 31 Patienten aufgrund der stark ausgeprägten oralen Mukositis bekräftigt die Bedeutung der oralen Mukositis für die onkologische Therapiekomplettierung, die Lebensqualität sowie die Compliance der Patienten.

Die Analyse der Mukositisausprägung der beiden untersuchten Patientengruppen zeigt eine prozentuale Häufung von Mukositiden \geq WHO Grad 3. Dabei verteilen sich die höhergradigen Mukositiden in der RCT-Gruppe auf WHO Grad 3 und 4, wobei es sich in der RT-Gruppe nur auf WHO Grad 3 Mukositiden beschränkt. Bei der Darstellung der verschiedenen Schweregrade der oralen Mukositis in einem RCT-Regime litten in unserer Studie im Gegensatz zur Literatur und im Vergleich zur RT-Gruppe die meisten Patienten an einer WHO Grad 2 Mukositis. Eine Erklärung hierfür könnte die intensivere Betreuung mittels Spülprogramm und Schmerztherapie der RCT-Patienten während der stationären Aufenthalte darstellen.

Entgegen der Literatur bildeten in der vorliegenden Studie mehr Patienten mit der toxizitätsärmeren Behandlung prozentual häufiger eine höhergradige orale Mukositis aus (Bernier J et al., 2004; Trotti A et al., 2003). ≈ 69 % der Patienten mit einer alleinigen RT litten mindestens an einer oralen Mukositis WHO Grad 3 im Gegensatz zu Patienten der RCT-Gruppe, in der ≈ 47 % der Patienten eine höhergradige orale Mukositis ausbildeten.

Die prozentualen Angaben bezüglich der Inzidenz höhergradiger Mukositiden variieren in der Literatur stark. Die vorliegenden Daten mit ≈ 69 % für die RT-Gruppe reißen sich in das Spektrum der Literatur mit Angaben zwischen 34 % (Trotti A et al., 2003) und 80 % (Stokman MA et al., 2005) ein.

Diskussion

Der Unterschied zwischen RT- und RCT-Gruppe kann unter anderem auch darauf zurückzuführen sein, dass die grobe Unterteilung zur statistischen Analyse in WHO Grad ≤ 2 und ≥ 3 die Verteilung in die Untergruppen WHO Grad 3 und 4 vernachlässigt. Hier bleibt anzumerken, dass ausschließlich Patienten der RCT-Gruppe eine Mukositis WHO Grad 4 aufwiesen. Dies kann ein Hinweis für den zusätzlichen Toxizitätsfaktor Chemotherapie sein.

5.2.2 DSB-Reparatur

Unter der Annahme einer Korrelation der γ H2AX-Foci mit radiogen entstandenen DSB und der Übereinstimmung der residualen γ H2AX-Foci mit bestehenden DSB werden im Folgenden die Ergebnisse besprochen.

Mittels der γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode zeigen die erhobenen Daten bei jedem Patienten eine Grundanzahl von DSB in den Blutlymphozyten vor der ersten Bestrahlung. Diese Kontrollwerte entsprechen im Mittelwert denen vorausgegangener Studien, die mit der γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode durchgeführt wurden (Kuefner MA et al., 2010; Löbrich M et al., 2005; Rothkamm K und Löbrich M, 2003; Rothkamm K et al., 2007; Sak A et al., 2009). Dabei wurden keine Unterschiede der Kontrollwerte für die beiden Therapiegruppen und für die Mukositisgruppen beobachtet, wie es auch bei Werbrouck J et al. bestätigt wird (Werbrouck J et al., 2011).

Die Zeitpunkte zur Blutentnahme wurden anhand vorheriger Erfahrungen aus anderen Protokollen gewählt. Die maximale γ H2AX-Focianzahl wurde in einigen Studien bereits drei Minuten nach Bestrahlung detektiert (Kühne M et al., 2004; Rothkamm K und Löbrich M, 2003; Wilson PF et al., 2009). Zu Beginn sind die entstandenen γ H2AX-Foci noch klein und matt. Erst im Verlauf gewinnen sie an Intensität und Größe (Rothkamm K und Horn S, 2009), so dass sich eine Zeitspanne zwischen 15 und 30 Minuten nach Strahlenexposition zur zuverlässigen Detektion eignet (Kegel P et al., 2007; Löbrich M et al., 2005; Sak A et al., 2007). Die weiteren Intervalle von zweieinhalb, fünf und 24 Stunden wurden ausgewählt um den Reparaturverlauf der DSB zu erfassen und die unterschiedlichen Reparaturgeschwindigkeiten abzubilden.

Diskussion

Zwei Geschwindigkeitsphasen werden grundsätzlich bei der DSB-Reparatur beschrieben: In den ersten Stunden überwiegt die schnelle Reparaturkomponente, im Anschluss dominiert die langsamere (Cucinotta FA et al., 2008; Kühne M et al., 2004; Riballo E et al., 2004; Rothkamm K et al., 2007). Rothkamm und Horn zeigten *in vitro* eine Reparatur von 50 % in der ersten Stunde und weiteren 30 % in den folgenden Stunden (Rothkamm K und Horn S, 2009). Ähnlich berichteten *in vivo* Studien über eine prozentuale Abnahme der γ H2AX-Foci innerhalb der ersten zweieinhalb Stunden auf 70 % (Kuefner MA et al., 2009), nach acht Stunden waren in den Experimenten von Redon et al. 80 % der initial entstandenen γ H2AX-Foci verschwunden (Redon CE et al., 2009). Unsere Daten spiegeln diese Reparaturphasen auch wider und liegen im Vergleich dazu mit einer durchschnittlichen Reparatur von \approx 40 % der γ H2AX-Foci zwischen 30 Minuten und zweieinhalb Stunden und weiteren \approx 21 % zwischen fünf Stunden und 24 Stunden in einem niedrigeren Bereich. Eine Erklärung hierfür ist unter anderem in den unterschiedlichen Ausgangswerten der Berechnungen zu sehen. Im Gegensatz zum Ausgangswert in der vorliegenden Studie von 30 Minuten nach Strahlenexposition betrug der Ausgangswert wenige Minuten bei Rothkamm und Horn und 15 Minuten bei Kuefner et al. (Kuefner MA et al., 2009; Rothkamm K und Horn S, 2009).

Die Anzahl der verbliebenen γ H2AX-Foci nach 24 Stunden in unserer Studie zeigen, dass ab mehreren 100 mGy Strahlenbelastung die Zelle eine Schwelle erreicht, an der sie innerhalb von 24 Stunden die entstandenen DSB nicht vollständig reparieren kann (Banáth JP et al., 2004; Rothkamm K und Löbrich M, 2003; Rube CE et al., 2010b; Wilson PF et al., 2009). Im Gegensatz dazu sind Lymphozyten nach einer relativ geringen Strahlenexposition wie z.B. nach einer CT Untersuchung in der Lage die entstandenen DSB innerhalb von 24 Stunden auf das Normalmaß vor Strahlenbelastung zu reparieren (Löbrich M et al., 2005). Ergänzend wiesen *in vitro* Studien darauf hin, dass die Zellen erst ab einem gewissen Schaden beginnen die DSB zu reparieren. Entstandene DSB durch Strahlendosen kleiner als 10 mGy verbleiben für mehrere Tage in menschlichen Fibroblasten und Lymphozyten unrepariert. Hierbei ist die Reparaturgeschwindigkeit auch deutlich geringer, als bei Dosen größer als 20 mGy (Grudzinski S et al., 2010; Rothkamm K und Löbrich M., 2003).

5.2.3 Reparaturparameter

Im untersuchten Kollektiv können, wie dargestellt, die Bestrahlungsvolumina und die applizierte Dosis auf die Mundschleimhaut hinsichtlich der Entstehung von γ H2AX-Foci als „confounding factor“ vernachlässigt werden, so dass im Folgenden die individuelle γ H2AX-Foci Reparaturkinetik als potentiell relevanter Einflussfaktor verglichen wird.

Insgesamt prägen interindividuelle Unterschiede der γ H2AX-Antwort die Ergebnisse nach Strahlenexposition. Die Studie versucht diese Unterschiede mit verschiedenen Parametern zu erfassen. Der angewandte Parameter RQ24 stützt sich auf das Ergebnis von Löbrich et al., der mit Hilfe der verbliebenen γ H2AX-Foci nach 24 Stunden einen Wert zur Erkennung von strahlensensiblen Patienten aufzeigen konnte (Löbrich M et al., 2005; Banáth JP et al., 2004). Eine in vivo durchgeführte Untersuchung an Zellreihen mit unterschiedlicher Reparaturkapazität konnte auch erfassbare Unterschiede der γ H2AX-Foci 24 Stunden nach Strahlenexposition beweisen (Bhogal N et al., 2010). Somit scheint der prozentuale γ H2AX-Foci-Wert nach 24 Stunden einen Hinweis auf die Reparaturfähigkeit zu geben. Zusätzlich bedient sich die Studie der prozentualen Reparaturanteile nach bestimmten Zeitpunkten um einen Anhaltspunkt für die verschiedenen Reparaturphasen zu erhalten. Insgesamt bilden die Parameter die unterschiedlichen Kinetiken jedoch nur unzureichend ab, da sie den konkreten Kurvenverlauf des Verschwindens der γ H2AX-Foci nicht widerspiegeln.

Im Gegensatz zu Studien an Zellkulturen, bei denen Zelllinien mit vorbeschriebenen Defekten der Reparaturkaskade mit Wildtyplinien verglichen werden, existieren bei unserer Untersuchung keine Vergleichsgruppen und keine Grenzwerte, die eine ungünstige Reparatur beschreiben. Die angewandte Unterteilung des Parameters RQ24 stützt sich auf die Verteilung einer Normalgewebsreaktion ähnlich der Gaußschen Normalverteilung. Bereits in Patientenkollektiven ab 30 Patienten konnte dieses Verteilungsschema aufgezeigt werden. Laut der Normalverteilung reagieren die meisten Patienten mit moderaten Nebenwirkungen, es gibt nur wenige Patienten, die gar keine bzw. sehr schwere Nebenwirkungen ausbilden (Burnet NG et al., 1998, Glicksman AS et al., 1960; Turesson I et al., 1996). In einer Studie mit der Fragestellung der Korrelation der Radiosensitivität mit späten Nebenwirkungen

Diskussion

konnten Hoeller et al. bei einem Wert des Mittelwerts plus die einfache Standardabweichung eine höhere Rate an stark ausgeprägten Nebenwirkungen erkennen (Hoeller U et al., 2003). Die Trennung des RQ24 bei 0,22 (Mittelwert plus einfache Standardabweichung) stellt in diesem Patientenkollektiv einen Anhaltspunkt dar, ab dem die Häufigkeit einer stark ausgeprägten akuten Strahlennebenwirkung genauer zu beleuchten ist. Die Ergebnisse zeigen auch, dass es ab einem $RQ24 \geq 0,22$ zu einem häufigeren Auftreten, insbesondere in der RT-Gruppe, von höhergradigen Mukositiden kommt. Dieses Ergebnis schließt jedoch die Ausbildung stark ausgeprägter Mukositiden im RQ24 Bereich $< 0,22$ nicht aus. Analog sind diese Ergebnisse beim Parameter RQ5 nachzuweisen. Hierbei ist jedoch die im Vergleich zum RQ24 ausgeprägte Standardabweichung des Parameters zu beachten.

Zusammenfassend liefert ein erhöhter Reparaturquotient einen Hinweis auf das häufigere Auftreten einer stark ausgeprägten Nebenwirkung, wohingegen bei normwertigem Reparaturquotient keine Vorhersage über die Ausprägung der akuten radiogenen Nebenwirkung möglich ist.

5.3 Diskussion der Ergebnisse im Kontext der Literatur

5.3.1 Ergebnisvergleich mittels γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode

Die meisten Studien, die sich der Immunfluoreszenzmethode zur Bestimmung der γ H2AX-Foci bedienten, beschäftigten sich mit dem in vitro Nachweis einer eingeschränkten DSB-Reparatur verschiedener Zellreihen mit unterschiedlicher Radiosensitivität. Die in vivo Durchführbarkeit an menschlichen Blutlymphozyten und die Sensitivität der Methode diesbezüglich wurde nur in wenigen vorhergehenden Studien bewiesen (Löbrich M 2005; Sak A et al., 2007). In Hinsicht auf ihre Bedeutung für Strahlennebenwirkungen wurde die Methode bisher nur selten untersucht.

Im Folgenden werden einige Studien besprochen, die sich unter Verwendung der γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode mit dem Zusammenhang der DSB-Reparaturkapazität und Strahlennebenwirkungen befasst haben.

Rübe et al. zeigten in Untersuchungen zur in vitro DSB-Reparatur bei tumor erkrankten Kindern eine erhöhte γ H2AX-Foci Anzahl acht Stunden nach Bestrahlung bei Kindern mit sehr stark ausgeprägten Nebenwirkungen im Therapieverlauf. Zusätzlich konnte ein Unterschied zwischen Kindern mit Tumorerkrankungen und gesunden Kindern bezüglich der DSB-Reparatur demonstriert werden (Rübe CE et al., 2010a).

Hingegen konnten Werbrouck et al. keine Korrelation zwischen der γ H2AX-Foci Reparaturkinetik und dem Auftreten von akuten Strahlennebenwirkungen feststellen. Die 2011 veröffentlichte Studie unterscheidet sich nur in wenigen Punkten bezüglich des Aufbaus zur vorliegenden Studie. Werbrouck et al. führten die Bestrahlungen der Blutproben in vitro im Wasserbad mittels ^{60}Co mit high-dose-rate (0,5 Gy/ min) durch. Außerdem wurden die akuten Strahlennebenwirkungen Dysphagie, Mukositis und Dermatitis nach Common Terminology Criteria for Adverse Events Skala Version 3.0 der 31 Patienten in drei Gruppen eingeteilt. Dabei bestand kein Unterschied der drei Gruppen bezüglich der residualen γ H2AX-Foci nach 24 Stunden und der Reparaturgeschwindigkeit. (Werbrouck J et al., 2011). Werbrouck et al. konnten auch in einer vorhergehenden Studie mit Patientinnen, die an gynäkologischen Tumoren litten, keine Korrelation zwischen späten

Diskussion

strahlenbedingten Nebenwirkungen und in vitro gemessenen γ H2AX-Foci nach 24 Stunden aufzeigen (Werbrouck J et al., 2010).

Unsere vorliegenden Ergebnisse zeigen, vor allem in der RT-Gruppe, eine Tendenz zur Ausbildung einer stark ausgeprägten oralen Mukositis ab einer Abweichung des Reparaturparameters vom Mittelwert größer der einfachen Standardabweichung. Im Gegensatz zu Werbrouck weisen Patienten mit einer tendenziell langsameren DSB-Reparatur innerhalb der ersten 24 Stunden häufiger eine orale Mukositis WHO ≥ 3 auf.

Neben der unterschiedlichen Strahlenquelle, kann hierbei der entscheidende Unterschied zu unserer Studie in der ex vivo Durchführung der Untersuchungen liegen. Eine vorhergehende Studie zeigte z.B. auf, dass eine Bestrahlung von Zellen auf gläsernen Objektträgern zu zusätzlichen DNS-Schäden der Zellen führt (Kegel P et al., 2007). Bei Werbrouck et al. wurde zwar die Strahlenapplikation in dem Gewebeäquivalent Wasser durchgeführt, was aber keine zusätzlichen Wechselwirkungsprozesse, wie sie auch im menschlichen Gewebe vorhanden wären, nach sich zieht. Die in vitro Bestrahlung vernachlässigt zwangsläufig den Einfluss und Austausch des biologischen Milieus und der Kompartimente bei der Reparatur der entstandenen Schäden nach Bestrahlung. Löbrich et al. demonstrierten, dass eine in vivo Untersuchung zur Detektion einer fehlerhaften DSB-Reparatur beim Menschen notwendig zu sein scheint. Ein in vivo vorhandener Reparaturdefekt einer Patientin konnte in vitro nicht nachgewiesen werden (Löbrich M et al., 2005). Die Variabilität dieser Ergebnisse in vivo im Vergleich zu in vitro deutet auf die Wichtigkeit des biologischen Milieus für die stattfindenden Interaktionen der verschiedenen DSB-Reparaturenzyme hin.

Zur Erkennung von strahlensensiblen Geweben scheint auch die Kumulation von DSB nach fraktionierter Bestrahlung von Bedeutung zu sein. Rube et al. konnten in vivo zeigen, dass eine defiziente Reparatur bei einem sehr geringen Reparaturdefekt wie eine ATM-Heterozygotie noch nicht eindeutig nach einer Bestrahlungsfraktion zu erkennen ist. Die Einschränkung der Reparatur wurde erst nach fraktionierter Bestrahlung durch eine vermehrte Kumulation anschaulich (Rube CE et al., 2010b). Dieser Aspekt wurde in der vorliegenden Studie nicht miterfasst. So kann es von Interesse sein, auch diesen Gesichtspunkt für die Bestimmung der Radiosensitivität in kommenden Studien abzubilden und in Korrelation zur Ausprägung der Akutstrahlennebenwirkungen zu setzen.

5.3.2 Ergebnisvergleich mittels Alternativmethoden

Vor der Erforschung der γ H2AX als DSB-Marker bedienten sich ältere Studien unterschiedlicher Methoden um die Radiosensitivität zu messen und sie sowohl mit den akuten als auch späten Strahlennebenwirkungen in ein Verhältnis zu setzen. Sie untersuchten vorrangig die in vitro Radiosensitivität bei Patienten mit einer Radiotherapie bei Mammakarzinomen und Kopf-Hals-Karzinomen, da sich die akuten sowie späten radiogenen Nebenwirkungen bei diesen Entitäten aufgrund der Häufigkeit und Lokalisation zur Erfassung in einer klinischen Studie eignen.

Folgend werden nur beispielhaft einige Studien genannt, die zum Teil zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt haben.

DSB-Untersuchungen von Wang et al. in Blutlymphozyten mit der PFGE deuteten auf eine Korrelation zwischen initial entstandenen DSB pro Gy und den akuten Strahlennebenwirkungen bei Kopf-Hals Bestrahlungen hin (Wang W-D et al., 2005). Dabei ist zu beachten, dass die initiale absolute Anzahl von DSB nach einer Radiotherapie nicht nur im Zusammenhang mit der Radiosensitivität, sondern auch den extrinsischen Einflussfaktoren steht. Mittels Gelelektrophorese konnten El-Awady et al. keine Korrelation zwischen einer akuten radiogenen Dermatitis bei Patienten mit einem Mammakarzinom und residualen DSB in menschlichen Fibroblasten nachweisen (EL-Awady RA et al., 2005). Auch Kiltie et al. kamen in ihren Untersuchungen bei späten Nebenwirkungen bei Mammakarzinom Patienten zu keinem anderen Ergebnis (Kiltie AE et al., 1999).

Ähnlich verhält es sich mit Studien bei Bestrahlungen der Mamma unter Verwendung des Comet Assay, der in den Analysen keine eindeutige Aussage zur Abhängigkeit der Nebenwirkungen bei Mammabestrahlungen von der DSB-Reparatur treffen konnte. Gabelova et al. zeigten mit Hilfe dieses Tests an Patienten mit Cervixkarzinomen, dass bei stark ausgeprägten strahlenbedingten Nebenwirkungen ein signifikantes Defizit in der Reparatur von DSB im Vergleich zu weniger stark ausgeprägten Nebenwirkungen vorliegt (Gabelova A et al., 2008). Auch Alapetite et al. wiesen im Hinblick auf die Entstehung akuter Dermatitis bei Mammabestrahlungen eine Korrelation zwischen den initial entstanden DSB und einer verzögerten DSB-Reparatur nach (Alapetite C et al., 1999). Twardella et al. konnten hingegen keinen Zusammenhang zwischen der DSB-Reparatur oder der

Diskussion

Grundanzahl an DSB mit der akuten Nebenwirkung bei Patienten mit einem Mammakarzinom demonstrieren (Twardella D et al., 2003).

Auch Chromosomenaberrationstests wiesen diskrepante Resultate auf und ließen keine konkrete Aussage bezüglich des Zusammenhangs zwischen Chromosomenaberrationen und akuten sowie späten Strahlennebenwirkungen bei Kopf-Hals-Karzinomen zu (Borgmann K et al., 2002; Lisowska H et al., 2006).

Ältere Studien, die mit Hilfe der Überlebenszeit in Zellkulturen die Radiosensitivität zu bestimmen versuchten, konnten Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Zellüberleben und den akuten oder späten Strahlennebenwirkungen bei Kopf-Hals-Karzinom Patienten mit Radiotherapie erbringen (Geara FB et al., 1993; Oppitz U et al., 2001; Rudat V et al., 1999).

Diese unterschiedlichen Methoden versuchen auf ihre Weise die individuelle intrinsische Radiosensitivität mit den akuten sowie späten Nebenwirkungen zu korrelieren. Dabei besteht ein inhomogenes Spektrum an verschiedenen Parametern, die zur Bestimmung verwendet werden. Somit ist bei fehlenden einheitlichen Versuchsabläufen ein Vergleich der Untersuchungen schwierig. Jede einzelne Untersuchungsmethode birgt Vor- und Nachteile sowie Schwächen im Bezug auf die Ergebnisauswertung und Einflussfaktoren, denen Rechnung getragen werden sollte.

Wichtige Nachteile der genannten Methoden in der klinischen Anwendung zur Bestimmung der DSB-Reparatur und Radiosensitivität der Patienten liegen in der Notwendigkeit von in vitro-Kulturbedingungen und hohen Bestrahlungsdosen (5-50 Gy). Die γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode bietet demgegenüber die Vorteile der Durchführbarkeit mit klinisch relevanten Bestrahlungsdosen unter in vivo-Bedingungen.

5.4 Ausblick

5.4.1 Bestimmung der γ H2AX als prädiktiver Test

Die Studie stellt die Praktikabilität der Anwendung der Methode in einem klinischen Setting unter Beweis. Die vorliegenden Ergebnisse sowie die Untersuchungen von Rübe et al. demonstrierten die Eignung der γ H2AX-Bestimmung zur Identifikation von Patienten, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von schweren Nebenwirkungen besitzen (Rübe CE et al., 2010a).

Aufgrund der geringen Zahl von Studienteilnehmern muss von einer eingeschränkten Aussagefähigkeit der Ergebnisse insbesondere im Bezug auf die statistische Auswertung mittels t-Test für unabhängige Stichproben ausgegangen werden. Beim Parameter RQ5 fallen zudem die große Standardabweichung und ausgeprägte Spannweite auf, so dass weitere Studien mit größerer Teilnehmerzahl notwendig sind, um die Ergebnisse zu validieren. Genügend große Studienkollektive fehlen auch zur Erstellung eines prädiktiven Tests und zur Evaluation weiterer Einflussfaktoren auf die DSB- und Mukositisentstehung. Dabei besteht bei den extrinsischen Einflussfaktoren noch Aufklärungsbedarf im Bezug auf die Rauchgewohnheiten (siehe 5.1.1) und auf den Einfluss einer fraktionierten Bestrahlung auf die Ergebnisse (siehe 5.3.1.). Außerdem bleibt die grundlegende Problemstellung im Hinblick auf die Übereinstimmung zwischen γ H2AX-Foci und DSB sowie residualer Foci weiter zu analysieren (siehe 5.1.3).

Ferner darf die Frage bezüglich einer fehlerlosen Reparatur der DSB nicht unvergessen bleiben. Zwar korrelierte das Abnehmen der γ H2AX-Foci in mehreren unterschiedlichen Methoden (wie Immunfluoreszenz, Comet Assay, Durchflusszytometrie) mit der Fähigkeit der DSB-Reparatur, jedoch bleibt der Nachweis über die Genauigkeit der DSB-Reparatur noch zu erbringen.

Grundsätzlich sollte neben der Bestimmung der DSB als Marker für die intrinsische Radiosensitivität auch der Einfluss der genetischen Variationen auf die Aktivität der Schadenserkenungs- und Reparaturenzyme sowie das Zellmilieu und die Zytokine nicht vernachlässigt werden, da diese gegebenenfalls über biologische Effekte und Wechselwirkungen Veränderungen in Normalgeweben nach erfolgter Bestrahlung ausüben können.

Diskussion

Zusammenfassend könnte die Bestimmung der individuellen Radiosensitivität schwere Strahlennebenwirkungen durch eine Individualisierung der Bestrahlungsplanung vermeiden und die Compliance der Patienten zur Vervollständigung der Therapie erhöhen.

5.4.2 γ H2AX als therapeutischer Ansatzpunkt

Einige Studien sehen in dem Histon H2AX einen medikamentösen Ansatzpunkt zur weiteren Therapieverbesserung in der Onkologie. Wird die Entstehung bzw. die Funktion von γ H2AX behindert, werden Interaktionen mit verschiedenen Reparaturenzymen und -prozessen sowie eine erhöhte Rate apoptotischer Zellen induziert. Gelänge dies in malignen Zellen, könnte der Erfolg der Radiotherapie gesteigert werden (Kao J et al., 2006; Taneja N et al., 2004).

6. Literaturverzeichnis

1. Alapetite C, Thirion P, de la Rochefordière A, Cosset JM, Moustacchi E (1999) Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. *Int J Cancer* 83:83-90.
2. Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J (2002) Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis--where and how to look for it? *Radiother Oncol* 64:131-40.
3. Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Overgaard J (2003) Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. *Radiother Oncol* 69:127-135.
4. Andreassen CN, Overgaard J, Alsner J, Overgaard M, Herskind C, Cesaretti JA, Atencio DP, Green S, Formenti SC, Stock RG, Rosenstein BS (2006) ATM sequence variants and risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis after post-mastectomy radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64:776-83.
5. Albino AP, Huang X, Jorgensen E, Yang J, Gietl D, Traganos F, Darzynkiewicz Z (2004) Induction of H2AX phosphorylation in pulmonary cells by tobacco smoke: a new assay for carcinogens. *Cell Cycle* 3:1062-8.
6. Badie C, Iliakis G, Foray N, Alsbeih G, Pantellias GE, Okayasu R, Cheong N, Russell NS, Begg AC, Arlett CF (1995) Defective repair of DNA double-strand breaks and chromosome damage in fibroblasts from a radiosensitive leukemia patient. *Cancer Res* 55:1232-4.
7. Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421:499-506.
8. Balducci L, Extermann M (2000) Management of cancer in the older person: a practical approach. *Oncologist* 5:224-37.
9. Banáth JP, Olive PL (2003) Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 63:4347-50.
10. Banáth JP, MacPhail SH, Olive PL (2004) Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res* 64:7144-9.
11. Barasch A, Peterson DE (2003) Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. *Oral Oncol* 39:91-100.

Literaturverzeichnis

12. Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, Monroe BC, Ciccone DN, Yan C, Vlasakova K, Livingston DM, Ferguson DO, Scully R, Alt FW (2002) Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8173-8.
13. Baumann M, Hölscher T, Begg AC (2003) Towards genetic prediction of radiation responses: ESTRO's GENEPI project. *Radiother Oncol* 69:121-5.
14. Beels L, Werbrouck J, Thierens H (2010) Dose response and repair kinetics of gamma-H2AX foci induced by in vitro irradiation of whole blood and T-lymphocytes with X- and gamma-radiation. *Int J Radiat Biol* 86:760-8.
15. Bentzen SM, Saunders MI, Dische S, Bond SJ (2001) Radiotherapy-related early morbidity in head and neck cancer: quantitative clinical radiobiology as deduced from the CHART trial. *Radiother Oncol* 60:123-35.
16. Bernier J, Dometge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre J-L, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M, Cognetti F, Bourhis J, Kirkpatrick A, van Glabbeke M (2004) Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 350:1945-52.
17. Bhogal N, Jalali F, Bristow RG (2009) Microscopic imaging of DNA repair foci in irradiated normal tissues. *Int J Radiat Biol* 85:732-46.
18. Bhogal N, Kaspler P, Jalali F, Hyriem O, Chen R, Hill RP, Bristow RG (2010) Late residual γ -H2AX in murine skin are dose responsive and predict radiosensitivity in vivo. *Radiat Res* 173:1-9.
19. Borgmann K, Röper B, El-Awady R, Brackrock S, Bigalke M, Dörk T, Alberti W, Dikomey E, Dahm-Daphi J (2002) Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. *Radiother Oncol* 64:141-52.
20. Bouquet F, Muller C, Salles B (2006) The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. *Cell Cycle* 5:1116-22.
21. Brizel DM, Murphy BA, Rosenthal DI, Pandya KJ, Glück S, Brizel HE, Meredith RF, Berger D, Chen MG, Mendenhall W (2008) Phase II study of palifermin and concurrent chemoradiation in head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 26:2489-96.
22. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276:42462-7.

Literaturverzeichnis

23. Burnet NG, Johansen J, Turesson I, Nyman J, Peacock JH (1998) Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. Steering Committee of the BioMed2 European Union Concerted Action Programme on the Development of Predictive Tests of Normal Tissue Response to Radiation Therapy. *Int J Cancer* 79:606-13.
24. Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Olaru A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296:922-7.
25. Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 5:675-9.
26. Chaplet M, Rai R, Jackson-Bernitsas D, Li K, Lin SY (2006) BRIT1/MCPH1: a guardian of genome and an enemy of tumors. *Cell Cycle* 5:2579-83.
27. Chen HT, Bhandoola A, Difilippantonio MJ, Zhu J, Brown MJ, Tai X, Rogakou EP, Brotz TM, Bonner WM, Ried T, Nussenzweig A (2000) Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX. *Science* 290:1962-5.
28. Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J (2005) γ -H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 20:801-9.
29. Chun HH, Gatti RA (2004) Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst)* 3:1187-96.
30. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmela AJ, Rotman M, Machtay M, Ensley JF, Chao KS, Schultz CJ, Lee N, Fu KK (2004) Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 350:1937-44.
31. Cornetta T, Festa F, Testa A, Cozzi R (2006) DNA damage repair and genetic polymorphisms: assessment of individual sensitivity and repair capacity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66:537-45.
32. Costes SV, Boissière A, Ravani S, Romano R, Parvin B, Barcellos-Hoff MH (2006) Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts. *Radiat Res* 165:505-15.

Literaturverzeichnis

33. Cowell IG, Sunter NJ, Singh PB, Austin CA, Durkacz BW, Tilby MJ (2007) γ H2AX foci form preferentially in euchromatin after ionising-radiation. *PLoS One* 2:e1057.
34. Cucinotta FA, Pluth JM, Anderson JA, Harper JV, O'Neill P (2008) Biochemical kinetics model of DSB repair and induction of γ -H2AX Foci by Non-homologous End Joining. *Radiat Res* 169:214-22.
35. Distel L, Neubauer S, Varon R, Holter W, Grabenbauer G (2003) Fatal toxicity following radio- and chemotherapy of medulloblastoma in a child with unrecognized nijmegen breakage syndrome. *Med Pediatr Oncol* 41:44-8.
36. Downs JA, Jackson SP (2004) A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:367-78.
37. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML (2007) Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 356:1944-56.
38. EL-Awady RA, Mahmoud M, Saleh EM, Abd El-Baky H, Lotayef M, Dahm-Daphi J, Dikomey E (2005) No correlation between radiosensitivity or double-strand break repair capacity of normal fibroblasts and acute normal tissue reaction after radiotherapy of breast cancer patients. *Int J Radiat Biol* 81:501-8.
39. Elci OC, Akpınar-Elci M (2009) Occupational exposures and laryngeal cancer among non-smoking and non-drinking men. *Int J Occup Environ Health* 15:370-3.
40. Elting LS, Keefe DM, Sonis ST, Garden AS, Spijkervet FKL, Barasch A, Tishler RB, Carty TP, Kudrimoti MK, Vera-Llonch M (2008) Patient-reported measurements of oral mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy with or without chemotherapy: demonstration of increased frequency, severity, resistance to palliation, and impact on quality of life. *Cancer* 113:2704-13.
41. Frankenberg-Schwager M, Kirchermeister D, Greif G, Baer K, Becker M, Frankenberg D (2005) Cisplatin-mediated DNA double-strand breaks in replicating but not in quiescent cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology* 212:175-84.
42. Gabelova A, Farkasova T, Gurska S, Machackova Z, Lukacko P, Witkovsky V (2008) Radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes from healthy donors and cervical cancer patients; the correspondance of in vitro data with the clinical outcome. *Neoplasma* 55:182-91.

Literaturverzeichnis

43. Gatti RA (2001) The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncol* 40:702-11.
44. Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Brock WA (1993) Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 27:1173-9.
45. Glicksman AS, Chu FC, Bane HN, Nickson JJ (1960) Quantitative and qualitative evaluation of skin erythema. II. Clinical study in patients on a standardized irradiation schedule. *Radiology* 75:411-5.
46. Golfier S, Jost G, Pietsch H, Lengsfeld P, Eckardt-Schupp F, Schmid E, Voth M (2009) Dicentric chromosomes and gamma-H2AX foci formation in lymphocytes of human blood samples exposed to a CT scanner: a direct comparison of dose response relationships. *Radiat Prot Dosimetry* 134:55-61.
47. Gotoff SP, Amirmokri E, Liebner EJ (1967) Ataxia telangiectasia. Neoplasia, untoward response to x-radiation and tuberous sclerosis. *Am J Dis Child* 116:617-25.
48. Graff P, Lapeyre M, Desandes E, Ortholan C, Bensadoun RJ, Alfonsi M, Maingon P, Giraud P, Bourhis J, Marchesi V, Mège A, Peiffert D (2007) Impact of intensity-modulated radiotherapy on health-related quality of life for head and neck cancer patients: matched-pair comparison with conventional radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 67:1309-17.
49. Grudzenski S, Raths A, Conrad S, Rube CE, Löbrich M (2010) Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 107:14205-10.
50. Hendry JH (2001) Genomic instability: potential contributions to tumour and normal tissue response, and second tumours, after radiotherapy. *Radiother Oncol* 59:117-26.
51. Ho AY, Atencio DP, Peters S, Stock RG, Formenti SC, Cesaretti JA, Green S, Haffty B, Drumea K, Leitzin L, Kuten A, Azria D, Ozsahin M, Overgaard J, Andreassen CN, Trop CS, Park J, Rodenstein BS (2006) Genetic predictors of adverse radiotherapy effects: the Gene-PARE project. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65:646-55.
52. Ho AY, Fan G, Atencio DP, Green S, Formenti SC, Haffty BG, Iyengar P, Bernstein JL, Stock RG, Cesaretti JA, Rosenstein BS (2007) Possession of ATM sequence variants as predictor for late normal tissue responses in breast cancer patients treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69:677-84.

Literaturverzeichnis

53. Hoeller U, Borgmann K, Bonacker M, Kuhlmeiy A, Bajrovic A, Jung H, Alberti W, Dikomey E (2003) Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* 69:137-44.
54. Horejsí Z, Falck J, Bakkenist CJ, Kastan MB, Lukas J, Bartek J (2004) Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. *Oncogene* 23:3122-7.
55. Hunter N, Börner GV, Lichten M, Kleckner N (2001) γ -H2AX illuminates meiosis. *Nat Genet* 27:236-8.
56. Iannuzzi CM, Atencio DP, Green S, Stock RG, Rosenstein BS (2002) ATM mutations in female breast cancer patients predict for an increase in radiation-induced late effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52:606-13.
57. Iwakawa M, Imai T, Harada Y, Ban S, Michikawa Y, Saegusa K, Sagara M, Tsuji A, Noda S, Ishikawa A (2002) Rad Genomics project. *Nihon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 62:484-9.
58. Johnson I, Spence MTZ (eds): The Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11. Auflage 2010. Kapitel 1.3. Alexa Fluor Dyes Spanning the Visible and Infrared Spectrum.
59. Kao J, Milano MT, Javaheri A, Garofalo MC, Chmura SJ, Weichselbaum RR, Kron SJ (2006) gamma-H2AX as a therapeutic target for improving the efficacy of radiation therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 6:197-205.
60. Karagiannis TC, Harikrishnan KN, El-Osta A (2007) Disparity of histone deacetylase inhibition on repair of radiation-induced DNA damage on euchromatin and constitutive heterochromatin compartments. *Oncogene* 26:3963-71.
61. Keefe DM, Schubert MM, Elting LS, Sonis ST, Epstein JB, Raber-Durlacher JE, Migliorati CA, McGuire DB, Hutchins RD, Peterson DE, Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology (2007) Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer* 109:820-31.
62. Kegel P, Riballo E, Kühne M, Jeggo PA, Löbrich M (2007) X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair* 6:1692-7.
63. Keogh MC, Kim JA, Downey M, Fillingham J, Chowdhury D, Harrison JC, Onishi M, Datta N, Galicia S, Emili A, Lieberman J, Shen X, Buratowski S, Haber JE, Durocher D, Greenblatt JF, Krogan NJ (2006) A phosphatase complex that dephosphorylates gamma H2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* 439:497-501.

Literaturverzeichnis

64. Kiltie AE, Barber JB, Swindell R, Ryan AJ, West CM, Hendry JH, Magee B (1999) Lack of correlation between residual radiation-induced DNA damage, in keratinocytes assayed directly from skin, and late radiotherapy reactions in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43:481-7.
65. Kimura H, Takizawa N, Allemand E, Hori T, Iborra FJ, Nozaki N, Muraki M, Hagiwara M, Krainer AR, Fukagawa T, Okawa K (2006) A novel histone exchange factor, protein phosphatase 2C gamma, mediates the exchange and dephosphorylation of H2A-H2B. *J Cell Biol* 175:389-400.
66. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G (2008) γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research* 36:5678-94.
67. Kobayashi J, Iwabuchi K, Miyagawa K, Sonoda E, Suzuki K, Takata M, Tauchi H (2008) Current topics in DNA double-strand break repair. *J Radiat Res* 49:93-103.
68. Kuefner MA, Grudzinski S, Schwab SA, Wiederseiner M, Heckmann M, Bautz W, Löbrich M, Uder M (2009) DNA double-strand breaks and their repair in blood lymphocytes of patients undergoing angiographic procedures. *Invest Radiol* 44:440-6.
69. Kuefner MA, Grudzinski S, Hamann J, Achenbach S, Lell M, Anders K, Schwab SA, Häberle L, Löbrich M, Uder M (2010) Effect of CT scan protocols on x-ray-induced DNA double-strand breaks in blood lymphocytes of patients undergoing coronary CT angiography. *Eur Radiol* 20:2917-24.
70. Kühne M, Riballo E, Rief N, Rothkamm K, Jeggo PA, Löbrich M (2004) A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res* 64:500-8.
71. Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JH, Kastan MB (2000) ATM phosphorylates p95/nbs1 in a S-phase checkpoint pathway. *Nature* 404:613-7.
72. Lisowska H, Lankoff A, Wieczorek A, Florek A, Kuszewski T, Gózdź S, Wojcik A (2006) Enhanced chromosomal radiosensitivity in peripheral blood lymphocytes of larynx cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66:1245-52.
73. Löbrich M, Rief N, Kühne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C, Uder M (2005) In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8984-9.
74. Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DM (2009) Is the pathophysiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis

Literaturverzeichnis

- influenced by the type of mucotoxic drug administered? *Cancer Chemother Pharmacol* 63:239-51.
75. MacPhail SH, Banáth JP, Yu TY, Chu EH, Lambur H, Olive PL (2003) Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int J Radiat Biol* 79:351-8.
 76. Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP (2009) Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J* 417:639-50.
 77. Mannironi C, Bonner WM, Hatch CL (1989) H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic Acids Res* 17:9113-26.
 78. Menegakis A, Yaromina A, Eichelner W, Dörfler A, Beuthien-Baumann B, Thames HD, Baumann M, Krause M (2009) Prediction of clonogenic cell survival curves based on the number of residual DNA double strand breaks measured by gammaH2AX staining. *Int J Radiat Biol* 85:1032-41.
 79. Mirzayans R, Severin D, Murray D (2006) Relationship between DNA double-strand break rejoining and cell survival after exposure to ionizing radiation in human fibroblast strains with differing ATM/p53 status: implications for evaluation of clinical radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66:1498-505.
 80. Moreno-Lopez LA, Esparza-Gómez GC, González-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, González-Hernández MJ, Domínguez-Rojas V (2000) Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol* 36:170-174.
 81. Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A, Burma S (2006) DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair* 5:575-90.
 82. Murphy BA, Beaumont JL, Isitt J, Garden AS, Gwede CK, Trotti AM, Meredith RF, Epstein JB, Le QT, Brizel DM, Bellm LA, Wells N, Cella D (2009) Mucositis-related morbidity and resource utilization in head and neck cancer patients receiving radiation therapy with or without chemotherapy. *Pain Symptom Manage* 38:522-32.
 83. Nakada S, Chen GI, Gingras AC, Durocher D (2008) PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep* 9:1019-26.
 84. Narayan S, Lehmann J, Coleman MA, Vaughan A, Yang CC, Enepekides D, Farwell G, Purdy JA, Laredo G, Nolan K, Pearson FS, Vijayakumar S (2008)

Literaturverzeichnis

- Prospective evaluation to establish a dose response for clinical oral mucositis in patients undergoing head-and-neck conformal radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 72:756-62.
85. Nick McElhinny SA, Snowden CM, McCarville J, Ramsden DA (2000) Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol* 20:2996-3003.
 86. Olive PL, Banáth JP (2004) Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58:331-5.
 87. Oppitz U, Denzinger S, Nachtrab U, Flentje M, Stopper H (1999) Radiation-induced comet-formation in human skin fibroblasts from radiotherapy patients with different normal tissue reactions. *Strahlenther Onkol* 175:341-6.
 88. Oppitz U, Baier K, Wulf J, Schakowski R, Flentje M (2001) The in vitro colony assay: a predictor of clinical outcome. *Int J Radiat Biol* 77:105-10.
 89. Peters LJ, Goepfert H, Ang KK, Byers RM, Maor MH, Guillaumondegui O, Morrison WH, Weber RS, Garden AS, Frankenthaler RA (1993) Evaluation of the dose for postoperative radiation therapy of head and neck cancer: first report of a prospective randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26:3-11.
 90. Petersen S, Casellas R, Reina-San-Martin B, Chen HT, Difilippantonio MJ, Wilson PC, Hanitsch L, Celeste A, Muramatsu M, Pilch DR, Redon C, Ried T, Bonner WM, Honjo T, Nussenzweig MC, Nussenzweig A (2001) AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature* 414:660-5.
 91. Plowman PN, Bridges BA, Arlett CF, Hinney A, Kingston JE (1990) An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia. *Br J Radiol* 63:624-8.
 92. Rades D, Kronemann S, Meyners T, Bohlen G, Tribius S, Kazic N, Schroeder U, Hakim SG, Schild SE, Dunst J (2010) Comparison of four Cisplatin-based radio-chemotherapy regimens for nonmetastatic stage III/IV squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Epub ahead of print].
 93. Redon CE, Dickey JS, Bonner WM, Sedelnikova OA (2009) Gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Adv Space Res* 43:1171-8.
 94. Riballo E, Kühne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, Jeggo PA, Löbrich M (2004) A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to γ -H2AX foci. *Mol Cell* 16:715-24.

Literaturverzeichnis

95. Robert Koch Institut (ed) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (2008) Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends (Bd. 6 überarbeitete Auflage).
96. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-68.
97. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905-16.
98. Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM (2000) Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* 275:9390-5.
99. Rosenthal DI, Trotti A (2009) Strategies for managing radiation-induced mucositis in head and neck cancer. *Semin Radiat Oncol* 19:29-34.
100. Rothkamm K, Löbrich M (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci* 100:5057-62.
101. Rothkamm K, Balroop S, Shekhdar J, Fernie P, Goh V (2007) Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure. *Radiology* 242:244-51.
102. Rothkamm K, Horn S (2009) Gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann Ist Super Sanita* 45:265-71.
103. Rudat V, Dietz A, Nollert J, Conradt C, Weber KJ, Flentje M, Wannemacher M (1999) Acute and late toxicity, tumour control and intrinsic radiosensitivity of primary fibroblasts in vitro of patients with advanced head and neck cancer after concomitant boost radiochemotherapy. *Radiother Oncol* 53:233-45.
104. Rube CE, Grudzinski S, Kühne M, Dong X, Rief N, Löbrich M, Rube C (2008a) DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res* 14:6546-55.
105. Rube CE, Dong X, Kühne M, Fricke A, Kaestner L, Lipp P, Rube C (2008b) DNA double-strand break rejoining in complex normal tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 72:1180-7.
106. Rube CE, Fricke A, Schneider R, Simon K, Kühne M, Fleckenstein J, Gräber S, Graf N, Rube C (2010a) DNA repair alterations in children with pediatric

Literaturverzeichnis

- malignancies: novel opportunities to identify patients at risk for high-grade toxicities. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 78:359-69.
107. Rube CE, Fricke A, Wendorf J, Stützel A, Kühne M, Ong MF, Lipp P, Rube C (2010b) Accumulation of DNA double-strand breaks in normal tissues after fractionated irradiation. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 76:1206-13.
108. Rube CE, Lorat Y, Schuler N, Schanz S, Wennemuth G, Rube C (2011) DNA repair in the context of chromatin: New molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy. *DNA Repair* 10:427-37.
109. Rugg T, Saunders MI, Dische S (1990) Smoking and mucosal reactions to radiotherapy. *Br J Radiol* 63:554-6.
110. Russo G, Haddad R, Posner M, Machtay M (2008) Radiation treatment breaks and ulcerative mucositis in head and neck cancer. *Oncologist* 13:886-98.
111. Rydberg B (2000) Radiation-induced heat-labile sites that convert into DNA double-strand breaks. *Radiat Res* 153:805-12.
112. Saadeh CE (2005) Chemotherapy- and radiotherapy- induced oral mucositis: review of preventive strategies and treatment. *Pharmacotherapy* 25:540-54.
113. Sak A, Grehl S, Erichsen P, Engelhard M, Grannass A, Levegrün S, Pöttgen C, Groneberg M, Stuschke M (2007) gamma-H2AX foci formation in peripheral blood lymphocytes of tumor patients after local radiotherapy to different sites of the body: dependence on the dose-distribution, irradiated site and time from start of the treatment. *Int J Radiat Biol* 83:639-52.
114. Sak A, Grehl S, Engelhard M, Wierlemann A, Kaelberlah H-P, Erichsen P, Pöttgen C, Groneberg M, Stuschke M (2009) Long-term in vivo effects of Cisplatin on gamma-H2AX foci signaling in peripheral lymphocytes of tumor patients after irradiation. *Clin Cancer Res* 15:2927-34.
115. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268:1749-53.
116. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM (2002) Quantitative detection of (125) IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* 158:486-92.

Literaturverzeichnis

117. Sedelnikova OA, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, Barrett JC (2004) Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 6:168-70.
118. Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3:155-68.
119. Sonis ST (2004) A biological approach to mucositis. *J Support Oncol* 2:21-32.
120. Sprung CN, Chao M, Leong T, McKay MJ (2005) Chromosomal radiosensitivity in two cell lineages derived from clinically radiosensitive cancer patients. *Clin Cancer Res* 11:6352-8.
121. Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ (2003) MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421:961-6.
122. Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* 64:2390-6.
123. Stiff T, Walker SA, Cerosaletti K, Goodarzi AA, Petermann E, Concannon P, O'Driscoll M, Jeggo PA (2006) ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J* 25:5775-82.
124. Stokman MA, Sonis ST, Dijkstra PU, Burgerhof JG, Spijkervet FK (2005) Assessment of oral mucositis in clinical trials: impact of training on evaluators in a multi-centre trial. *Eur J Cancer* 41:1735-8.
125. Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123:1213-26.
126. Suzuki M, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M (2006) Phosphorylated histone H2AX foci persist on rejoined mitotic chromosomes in normal human diploid cells exposed to ionizing radiation. *Radiat Res* 165:269-76.
127. Swift M, Morrell ID, Cromartie E, Chamberlin AR, Skolnick MH, Bishop DT (1986) The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. *Am J Hum Genet* 39:573-83.
128. Takahashi A, Matsumoto H, Nagayama K, Kitano M, Hirose S, Tanaka H, Mori E, Yamakawa N, Yasumoto J, Yuki K, Ohnishi K, Ohnishi T (2004) Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing. *Cancer Res* 64:8839-45.

Literaturverzeichnis

129. Takai H, Smogorzewska A, de Lange T (2003) DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 13:1549-56.
130. Taneja N, Davis M, Choy JS, Beckett MA, Singh R, Kron SJ, Weichselbaum RR (2004) Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. *J Biol Chem* 279:2273-80.
131. Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, van Gent DC, Shiraishi T, Verkaik NS, vanHeems D, Ito E, Nakamura A, Sonoda E, Takata M, Takeda S, Matsuura S, Komatsu K (2002a) Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* 420:93-8.
132. Tauchi H, Matsuura S, Kobayashi J, Sakamoto S, Komatsu K (2002b) Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability. *Oncogene* 21:8967-80.
133. Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, Frame D, Fuchs HJ, Gwede CK, Komaroff E, Nalysnyk L, Zilberberg MD (2003) Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. *Radiother Oncol* 66:253-62.
134. Turesson I, Nyman J, Holmberg E, Odén A (1996) Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 36:1065-75.
135. Turner HC, Brenner DJ, Chen Y, Zhang J, Wang H, Lyulko OV, Xu Y, Shuryak I, Schaefer J, Simaan N, Randers-Pehrson G, Yao YL, Amundson SA, Garty G (2011) Adapting the γ -H2AX assay for automated processing in human lymphocytes.1. Technological aspects. *Radiat Res* 175:282-90.
136. Twardella D, Popanda O, Helmbold I, Ebbeler R, Benner A, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F, Schmezer P, Chang-Claude J (2003) Personal characteristics, therapy modalities and individual DNA repair capacity as predictive factors of acute skin toxicity in an unselected cohort of breast cancer patients receiving radiotherapy. *Radiother Oncol* 69:145-53.
137. Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, Ariail KS, Keener CL, Li S, Liu H, Farin FM, Potter JD (2001) Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 98:231-4.
138. Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 22:5612-21.

Literaturverzeichnis

139. Wang WD, Chen ZT, Li DZ, Cao ZH, Pu P, Fu SZ, Chen J, Sun SL, Chen XP (2005) Detecting normal cell radiosensitivity via assay of DNA damage in lymphocytes for individualizing radiotherapy in head and neck cancer patients. *Oncology* 69:208-213.
140. Ward IM, Chen J (2001) Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 276:47759-62.
141. Werbrouck J, De Ruyck K, Beels L, Vral A, Van Eijkeren M, De Neve W, Thierens H (2010) Prediction of late normal tissue complications in RT treated gynaecological cancer patients: potential of the γ -H2AX foci assay and association with chromosomal radiosensitivity. *Oncol Rep* 23:571-8.
142. Werbrouck J, Duprez F, De Neve W, Thierens H (2011) Lack of a correlation between γ H2AX foci kinetics in lymphocytes and the severity of acute normal tissue reactions during IMRT treatment for head and neck cancer. *Int J Radiat Biol* 87:46-56.
143. West CM, McKay MJ, Hölischer T, Baumann M, Stratford IJ, Bristow RG, Iwakawa M, Imai T, Zingde SM, Anscher MS, Bourhis J, Begg AC, Haustermans K, Bentzen SM, Hendry JH (2005) Molecular markers predicting radiotherapy response: report and recommendations from an International Atomic Energy Agency technical meeting. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62:1264-73.
144. Wilson PF, Nham PB, Urbin SS, Hinz JM, Jones IM, Thompson LH (2009) Inter-individual variation in DNA double-strand break repair in human fibroblasts before and after exposure to low doses of ionizing radiation. *Mutat Res* 683:91-7.
145. Wong PC, Dodd MJ, Miaskowski C, Paul SM, Bank KA, Shiba GH, Facione N (2006) Mucositis pain induced by radiation therapy: prevalence, severity, and use of self-care behaviors. *J Pain Symptom Manage* 32:27-37.
146. Wood JL, Singh N, Mer G, Chen J (2007) MCPH1 functions in an H2AX-dependent but MDC1-independent pathway in response to DNA damage. *J Biol Chem* 282:35416-23.
147. Woods WG, Byrne TD, Kim TH (1988) Sensitivity of cultured cells to gamma radiation in a patient exhibiting marked in vivo radiation sensitivity. *Cancer* 62:2341-5.
148. World Health Organisation (ed) (1979) *WHO handbook for reporting results of cancer treatment*. Geneva: offset publication 14-22.
149. Wyatt MD, Wilson DM (2009) Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cell Mol Life Sci* 66:788-799.

Literaturverzeichnis

150. Wygoda A, Maciejewski B, Skladowski K, Hutnik M, Pilecki B, Golen M, Rutkowski T (2009) Pattern analysis of acute mucosal reactions in patients with head and neck cancer treated with conventional and accelerated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 73:384-90.
151. Yuan J, Chen J (2009) MRE11/RAD50/NBS1 complex dictates DNA repair independent of H2AX. *J Biol Chem* 285:1097-104.
152. Zevallos JP, Mallen MJ, Lam CY, Karam-Hage M, Blalock J, Wetter DW, Garden AS, Sturgis EM, Cinciripini PM (2009) Complications of radiotherapy in laryngopharyngeal cancer: effects of a prospective smoking cessation program. *Cancer* 115:4636-44.

Publikation

7. Publikation

Teile dieser Arbeit wurde bereits 2010 veröffentlicht:

Fleckenstein J, Kühne M, Seegmüller K, Derschang S, Melchior P, Gräber S, Fricke A, Rube CE, Rube C. The impact of individual in vivo repair of DNA double-strand breaks on oral mucositis in adjuvant radiotherapy of head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010 Oct 13. [Epub ahead of print]

Danksagung

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes Herrn Prof. Dr. Ch. Rube für die Überlassung des Themas.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Fleckenstein für die persönliche Unterstützung und die fachlichen Ratschläge während des Verfassens der Dissertation bedanken.

Der Leiterin des Labors für molekulare Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes Frau Prof. Dr. C.E. Rube und den Mitarbeitern Herrn Dr. rer. nat. Martin Kühne, Herrn Dr. rer. nat. Andreas Fricke und Frau Daniela Ludwig möchte ich für die Anregungen und Hilfestellung bei den Laborarbeiten und Datenauswertung sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Sarah Derschang für die gute Zusammenarbeit, ihre Unterstützung und Motivation in unserem gemeinsamen Laboralltag.

Vielen Dank auch an Herrn Patrick Melchior für die Einführung in die Immunfluoreszenztechnik und sein offenes Ohr zu jederzeit.

Darüber hinaus danke ich Herrn PD Dr. Stefan Gräber für die Beratung bei der statistischen Datenauswertung.

Ein weiterer Dank gilt dem MTAR Team der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, insbesondere Herrn Georg Blass, die durch ihre Hilfsbereitschaft am Gelingen der Arbeit beteiligt waren.

Zum Schluss möchte ich meinem Freund Christoph und meinen Eltern herzlich danken, die mir unermüdlich moralischen Beistand leisteten und mir immer zur Seite standen.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katharina Seegmüller
Geburtsort: Zweibrücken
Geburtsdatum: 11.06.1984
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: evangelisch

Schulische Ausbildung

1990-1994: Grundschule Bubenhausen in Zweibrücken
1994-2003: Helmholtz-Gymnasium in Zweibrücken
18.03.2003: Allgemeine Hochschulreife

Studium

2003-2009: Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
09.09.2005: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03.11.2009: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

Seit 02/2010: Assistenzärztin in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie am Universitätsklinikum des Saarlandes