

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
Universitätsklinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

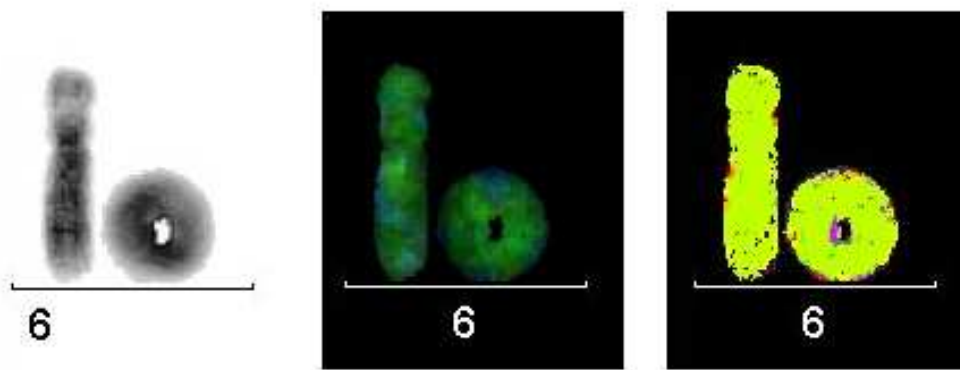
Direktor: Professor Dr. U. Claussen

und

dem Institut für Humangenetik in Tübingen

Leiter: Professor Dr. O. Rieß

Chromosomale Residualschäden nach Radiochemotherapie mit und ohne Gabe von Amifostin



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dipl. Biol. Mareike Franziska Claussen, geb. Dreidax
aus
Wilhelmshaven
2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Kaiser
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schwarz

DECKBLATT	1
INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
EINLEITUNG	8
1.1 Amifostin	8
1.1.1 Wirkmechanismus	9
1.1.2 Klinische Anwendung von Amifostin	12
1.1.3 Alkalische Phosphatase	12
1.2 Kolorektales Karzinom	14
1.2.1 Therapie des kolorektalen Karzinoms	15
1.2.2 Strahlentherapie	15
1.2.3 Chemotherapie und Zytostatika	17
1.2.4 Radiochemotherapie	18
1.3 DNA-Schäden	19
1.4 Lymphozyten	21
1.5 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	22
1.6 Zielstellung der Arbeit	26
MATERIAL UND METHODEN	29
2.1 Patienten und Therapieschema	29
2.1.1 Blutproben der 12 Patienten	30
2.1.2 Kultivierung der Blutproben	31
2.1.3 Chromosomenpräparation	32
2.1.4 Aufbereitung des Objektträgers	33
2.1.5 Denaturierung des OT	35
2.1.6 Färbung mit M-FISH	35
2.1.7 Labelschema	38
2.1.8 Graphische Darstellung der Chromosomen	39
2.1.9 Falschfarben	40
2.2 Auswertung	41
2.2.1 Aufnahmen der Mitosen und Bearbeitung	41
2.2.2 Analyse der Chromosomen und ihrer Schäden	41
2.2.3 Statistik	42

ERGEBNISSE	43
3.1 Ergebnisse der klinischen Fälle	43
Patient 1, mit Amifostin–Behandlung	43
Patient 2, mit Amifostin–Behandlung	47
Patient 3, ohne Amifostin–Behandlung	49
Patient 4, mit Amifostin–Behandlung	52
Patient 5, mit Amifostin–Behandlung	55
Patient 6, ohne Amifostin–Behandlung	58
Patient 7, mit Amifostin–Behandlung	60
Patient 8, mit Amifostin–Behandlung	62
Patient 9, ohne Amifostin–Behandlung	65
Patient 10, ohne Amifostin–Behandlung	68
Patient 11, mit Amifostin–Behandlung	72
Patient 12, ohne Amifostin–Behandlung	75
3.2 Auswertung / Statistik	78
3.2.1 Einfache Doppelstrangbrüche	81
3.2.2 Reziproke Translokationen	81
3.2.3 Einfache Translokationen	82
3.2.4 Inversionen und Ringchromosomen	82
3.2.5 Dizentrische Chromosomen	83
3.2.6 Komplexe chromosomale Rearrangements	83
3.2.7 Klonale Aberrationen	84
3.2.8 Mitotische Non-disjunctions	84
DISKUSSION	85
4.1 Fragestellung	85
4.2 Kritische Auseinandersetzung mit der Methodik	87
4.2.1 Patienten	87
4.2.2 Zeitraum Radiochemotherapie und Studie	88
4.2.3 Untersuchungsmaterial	88
4.2.4 Färbetechnik / Visualisierung der Chromosomen	89
4.2.5 Auswertung	90
4.3 Kritische Auseinandersetzung mit den Ergebnissen	90
4.3.1 Häufigkeit der chromosomalen Brüche in dieser Studie	91
4.3.2 Einfache Doppelstrangbrüche	92
4.3.3 Reziproke Translokationen	93
4.3.4 Einfache Translokationen	94
4.3.5 Inversionen und Ringchromosomen	94
4.3.6 Dizentrische Chromosomen	94
4.3.7 Komplexe Rearrangements	95
4.3.8 Klonale Veränderungen	95
4.3.9 Numerische Chromosomenaberrationen	95

Inhaltsverzeichnis	
4.4 Literatur	96
4.5 Schlussfolgerung und Zukunftsaussichten	97
ZUSAMMENFASSUNG	99
LITERATURVERZEICHNIS	100
Publikationen der Studie	100
Verwendete Quellen	100
DANKSAGUNG	107
LEBENS LAUF	108

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
Ace	Acentric Fragment (Rest eines Chromosoms, ohne Zentromer)
AP	Alkalische Phosphatase
B“	Bruch eines Chromosoms
B/M	Brüche pro Metaphase–Kern
Ca	circa
CA	Karzinom
CCD–Kamera	charged coupled device–Kamera, gekühlter–ladungsgekoppelter Bildsensor
CCR	complex chromosomal rearrangement (komplexes chromosomales Rearrangement)
Chr	Chromosom (#)
Cy5	Cytochrom 5
Cy5.5	Cytochrom 5,5
DAPI	4´–6–Diamino–2–Phenylindol
Del	Deletion
Der	Derivatives Chromosom
Dic	Dizentrisches Chromosom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
Evtl	eventuell
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
5–FU	5–Fluorouracil
h	hour (Stunde)
Inv	Inversion
Min	Minuten

Abkürzungsverzeichnis

MP	Metaphase(n)
MW	Mittelwert
OT	Objektträger
Pat.	Patient
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen Konzentrationen
RCT	Radiochemotherapie
RT	Raumtemperatur
SpO	Spectrum Orange
SSC	Standard saline citrate, Natriumchlorid–Tri–Natriumcitrat
SSCT	SSC mit Tween® (Detergenz)
SSCTM	SSCT mit Marvel® (Trockenmilch)
Gy	1 Grey entspricht der aufgenommenen Strahlenenergie von einem Joule/Kg Gewebe.
T	Translokation
Tab.	Tabelle
TR	Texas Red
Tr	Reziproke Translokation
ZK	Zellkultur
*	Lokalisation des Zentromers, bei Translokationen

Einleitung

1.1 Amifostin

Amifostin, Handelsname Ethyol®, wird von der Firma Essex Pharma vertrieben und ist eine organische Thiophosphatverbindung (**Abb. 1.1**). Es gilt als Breitband-Zytoprotektivum bei der Behandlung von Krebspatienten. Seine Wirkung beruht auf dem selektiven Schutz gesunder Zellen, nicht jedoch maligner Zellen, gegen Zytostatika und die zytotoxische Wirkung ionisierender Strahlung (Spencer und Goa, 1995).

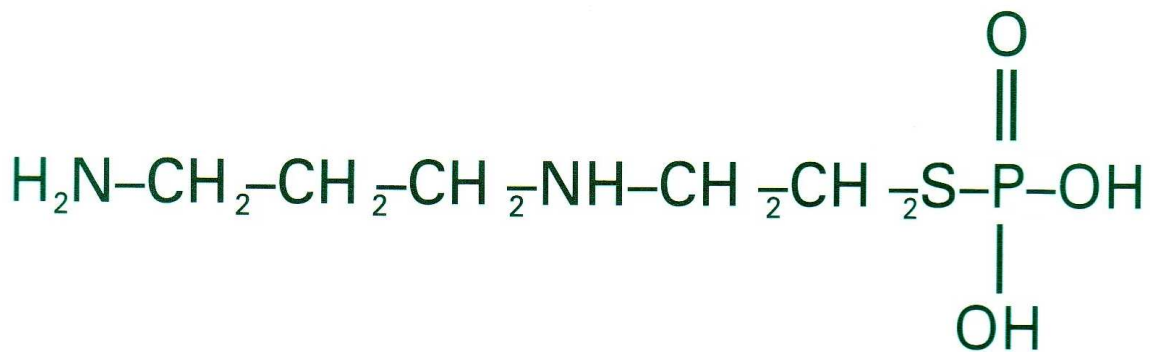


Abb. 1.1 Strukturformel des Radio/Chemoprotektivums Amifostin (Ethyol, Essex Pharma, 1998; modifiziert)

Pharmakokinetik

Nach intravenöser Applikation wird Amifostin schnell aus dem Plasma eliminiert, nach 6 min werden nur noch ca. 10 % des unveränderten Wirkstoffs gemessen. Amifostin wird rasch in den aktiven Metaboliten WR-1065 metabolisiert. Es findet sich eine Anreicherung im Knochenmark 5–8 min nach intravenöser Infusion (laut Herstellerangaben, Ethyol, Essex Pharma, 1998).

1.1.1 Wirkmechanismus

Amifostin (Ethyol®) liegt in aktiver (dephosphoryliert) und inaktiver Form (phosphoryliert) vor und ist somit ein Prodrug. Es wird nach intravenöser Applikation an Gefäßendothelien von einer zellmembranständigen alkalischen Phosphatase zum aktiven Thiol (WR-1065) dephosphoryliert (Hensley et al., 1999). Nach der Dephosphorylierung ist der aktive Metabolit in der Lage, die Zellmembran zu durchdringen und seine Wirkung intrazellulär zu entfalten. Da gesunde Zellen über eine größere Dichte der membranständigen alkalischen Phosphatase verfügen, kommt es hier zu einer gegenüber malignen Zellen deutlich stärkeren Anreicherung der protektiven Aktivität im Zellinneren (**Abb. 1.2 und 1.3**) (laut Herstellerangaben, Ethyol, Essex Pharma, 1998).

Normale Zelle

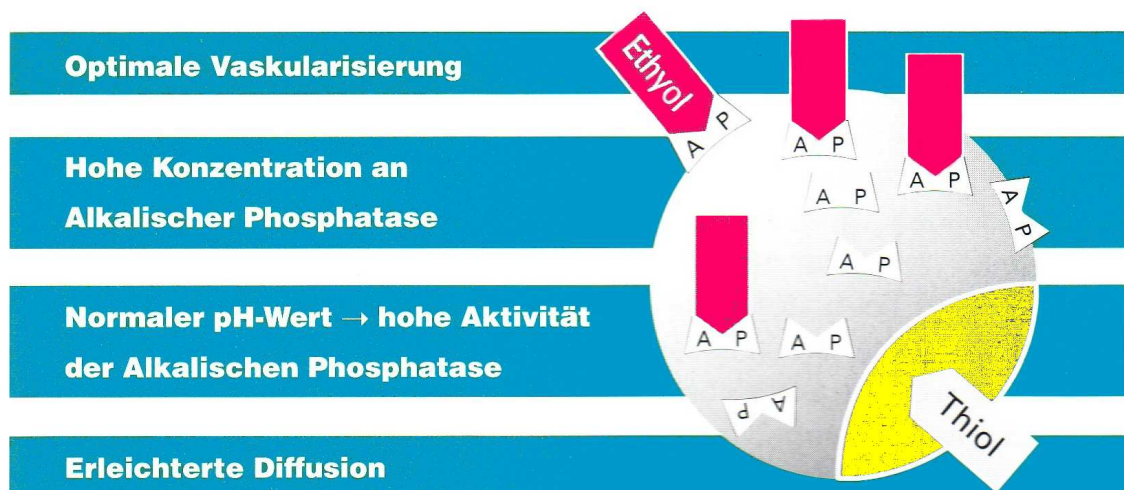


Abb. 1.2 Die normale Zelle exprimiert an ihrer Oberfläche viel alkalische Phosphatase. An dieser wird Amifostin vom Prodrug zum aktiven Metaboliten (Thiol) umgewandelt und erfährt so eine erleichterte Diffusion in die Zelle, wo es selektiv wirken kann (Ethyol, Essex Pharma, 1998; modifiziert).

Tumorzelle



Abb. 1.3 Tumorzellen exprimieren nur sehr wenig alkalische Phosphatase auf ihrer Oberfläche. So wird nur wenig Amifostin in den aktiven Metaboliten umgewandelt und es entsteht kein Schutz gegen Zytostatika oder ionisierende Strahlung innerhalb der Tumorzelle (Abb. übernommen aus: Ethyol, Essex Pharma, 1998).

Intrazellulär wird der aktive Metabolit durch Redoxreaktionen in das symmetrische Disulfid (R-S-S-R) mit der Bezeichnung WR-33278 umgewandelt (**Abb. 1.4**). Sowohl WR-1065 als auch WR-33278 besitzen zytoprotektive Wirksamkeit, aber unterschiedliche Wirkmechanismen. Die zytoprotektiven Eigenschaften von WR-1065 und seine Fähigkeit, freie Sauerstoffradikale einzufangen, sind gebunden an die aktuelle Exposition der Zelle gegenüber Strahlung oder Zytostatika (Smoluk et al., 1988). Dagegen hält der protektive Effekt von WR-33278 postexpositionell über mehrere Stunden an. WR-33278 reichert sich bevorzugt im Zellkern an, wo es sich an Kernproteine und DNA bindet. Es ist wahrscheinlich an verschiedenen intrazellulären Prozessen beteiligt, die die Chromatin-Stabilisierung, die DNA-Synthese, die Kinaseaktivität, die Genexpression und die Proteinkonformation beeinflussen, die alle an der Mutagenese beteiligt sind (Fiorio et al., 1994).

Einleitung

2. Als nukleophile Substanz interagiert es direkt mit den Zytostatika und deren Metaboliten und verhindert auf diese Weise die Induktion möglicher Zellschäden (Herstellerangaben, Ethyol, Essex Pharma, 1998).
3. Es fördert zelluläre Reparaturvorgänge durch seine reduzierenden Eigenschaften (Abgabe eines Wasserstoffatoms) bzw. sein Oxidationsprodukt WR-33278 (Herstellerangaben, Ethyol, Essex Pharma, 1998).

1.1.2 Klinische Anwendung von Amifostin

- Reduktion des auf Neutropenie (Abfall der neutrophilen Granulozyten) beruhenden Infektrisikos (neutropenisches Fieber). Durch Gabe der Zytostatika Cyclophosphat oder Cisplatin kann Neutropenie erzeugt werden (Hensley et al., 1999).
- Schutz bei fortgeschrittenen soliden Tumoren vor kumulativer Nierentoxizität bei Cisplatin-haltigen Therapieschemata mit Cisplatin-Dosen von 60–120 mg/m² Körperoberfläche. Angemessene Hydratation ist sicherzustellen (Ethyol, Essex Pharma, 1998).
- bei Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich zur Verringerung der Xerostomie. Dabei zeigt die mit Amifostin behandelte Patientengruppe signifikant weniger Nebenwirkungen an der Haut als die nicht randomisierten Kontrollgruppe, Phase-III-Studie (Brizel et al., 2000).
- bei der Behandlung fortgeschrittener Krebserkrankungen der Eierstöcke und
- während postoperativer Chemotherapie von Rektumkarzinomen, zur Reduzierung der strahleninduzierten Nebenwirkungen, Phase-II-Studie (Ethyol, Essex Pharma, 1998).

1.1.3 Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase (AP) kommt in allen Körperzellen vor und besteht aus einer Reihe von Unterenzymen. Sie wird vor allen Dingen in Kapillaren und

Einleitung

kleinen Venolen exprimiert, und verleiht so normalem Gewebe selektiven Schutz durch die optimale Umwandlung von Amifostin zu seinem aktiven Metaboliten (laut Herstellerangaben, Ethyol, Essex Pharma, 1998). Tumorgewebe allerdings ist schlechter vaskularisiert und verfügt deswegen über weniger alkalische Phosphatase (Hensley et al., 1999, Niedermayer et al., 1998). Gleichzeitig führt die schlechtere Vaskularisierung zu einer Hypoxie des umliegenden Gewebes. Es kommt zu anaeroben Stoffwechselfvorgängen und so zu einem sauren Milieu, was die katalytische Aktivität der sowieso schon wenig vorhandenen alkalischen Phosphatase noch zusätzlich reduziert. Das Ausmaß der zellulären Aufnahme von WR-1065 ist vom Gewebe-pH-Wert abhängig. Bei einer pH-Senkung um beispielsweise 0,3 wird die Aufnahme um mehr als die Hälfte reduziert (Strnad, 2000). So kann eine bis zu 100-fach erhöhte Konzentrationen von freiem Thiol in normalem Gewebe gegenüber Tumorgewebe nachweisbar sein (Hensley et al., 1999). Dies führt zu selektivem Schutz des umliegenden normalen Gewebes und der Empfindlichkeit des Tumorgewebes auf Strahlung und Zytostatika. Bei einigen Meningeomen kann es aufgrund einer Deletion im Chromosom 1 (1p-Region) auch zu einem kompletten Ausfall der alkalischen Phosphatase kommen (Niedermayer et al., 1998).

Zu einer Erhöhung der AP kann es bei folgenden Symptomen kommen:

Bei der akuten Hepatitis, beim Verschluss-Ikterus, bei Leberschäden, durch Arzneimittel / Gifte, durch Knochenmetastasen, bei Osteomalazie, sowie bei Frakturen, Osteoporose, Vitamin-D-Mangel, Hyperparathyreodismus, Abflußstörungen der Gallensäuren oder im letzten Drittel der Schwangerschaft (Ethyol, Essex Pharma, 1998).

Eine verminderte Aktivität der alkalischen Phosphatase findet sich bei:

Eiweißmangelerkrankungen, nach Bypass-Operationen, bei Magnesium-Zinkmangel, bei Hypothyreose, bei schwerer Anämie, beim Morbus Wilson, bei Vitamin C Mangel und vor allen Dingen bei Karzinomen (Ethyol, Essex Pharma, 1998).

1.2 Kolorektales Karzinom

Maligne Tumorzellen haben sich der normalen Wachstumsregulation entzogen und wachsen ungehemmt destruierend, infiltrierend, bilden Metastasen und neigen zur Rezidivierung. Bösartige Neubildungen des Kolorektems stellen in Deutschland eine häufige Krebstodesursache dar. Mehr als 30 000 Menschen sterben jährlich am kolorektalen Karzinom. Circa 50 000 Neuerkrankungen werden pro Jahr mit steigender Tendenz registriert (siehe zusammenfassende Darstellung bei Bühling et al., 1995).

Das Vorkommen des kolorektalen Karzinoms hat sich von 1960 bis 1980 verdoppelt und stabilisiert sich auf hohem Niveau. Das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, beträgt für die Bundesbürger derzeit vier bis sechs Prozent. Weltweit gibt es bezüglich der Sterblichkeit durch Darmkrebs große Unterschiede. In Deutschland ist die Sterblichkeit infolge Darmkrebs deutlich höher als in den USA und in Japan (siehe Zusammenfassung bei Mack et al., 2002).

Als Risikofaktoren spielen die Ernährungsgewohnheiten eine große Rolle. Besonders ein hoher Fettanteil, reduzierte Ballaststoffe und fleischreiche Ernährung scheinen sich negativ auszuwirken. Neben molekulargenetischen Mechanismen wie Onkogen-Aktivierung und Verlust von Tumor-Suppressorgenen kommen auch genetische Dispositionen in Betracht (siehe Überblick bei Bühling et al., 1995).

- a) Adenomatöse Polyposis (APC, Locus 5q21, Gen APC) wird autosomal dominant vererbt. Der Dickdarm ist übersät mit Adenomen, die sich sehr wahrscheinlich zu invasiven Karzinomen entwickeln werden (siehe zusammenfassende Darstellung bei Strachan und Read, 1996).
- b) Erblicher nichtpolypöser Dickdarmkrebs (hereditary nonpolyposis colon cancer –HNPCC). Auch diese Art des Krebses ist autosomal dominant erblich und besitzt zusätzlich noch eine hohe Penetranz (siehe zusammenfassende Darstellung bei Strachan und Read, 1996).

1.2.1 Therapie des kolorektalen Karzinoms

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms wird je nach Ausmaß und Stadium des Tumors festgelegt. Das Behandlungskonzept beruht auf mehreren Säulen. Der Operation mit Entfernung des Tumors möglichst im Gesunden (R0 Resektion), der Radio – und der Chemotherapie (siehe Nr. 1, Leitlinien der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften zum Dickdarmkrebs).

1.2.2 Strahlentherapie

Bei der Strahlentherapie wird ionisierende Strahlung zur Therapie von Tumoren allein oder kombiniert mit chirurgischen oder chemotherapeutischen Maßnahmen eingesetzt. Normal- und Tumorgewebe unterscheiden sich durch ihre Reparaturfähigkeit. Es gibt spät und früh regenerierendes Gewebe und dementsprechend können optimale Bestrahlungsfractionen erstellt werden (siehe Überblick bei Schmitt, 1998). Dabei sollen eine maximale Tumorschädigung und gleichzeitig eine maximale Schonung des umgebenden gesunden Gewebes erreicht werden. Bei der neoadjuvanten (unterstützenden) Bestrahlung wird ionisierende Strahlung zur Vorbehandlung und ggf. Verkleinerung eines Tumors eingesetzt. Im Rahmen einer postoperativen Strahlentherapie wird der Tumor zunächst operativ entfernt und anschließend erfolgt die Bestrahlung. Die verordnete Strahlendosis in der Tumorthherapie richtet sich nach Größe, Histologie, Sauerstoffversorgung und Lokalisation des Tumors. Dabei sind die räumliche und zeitliche Dosisverteilung zu beachten. Die Energiedosis, die an einer definierten Stelle im bestrahlten Herdgebiet (Zielvolumen) eingesetzt wird, bezeichnet man als Referenzdosis. Unter Gesamtdosis versteht man die am Ende einer Bestrahlungsserie insgesamt eingestrahelte Referenzdosis. Durch Fraktionierung, d.h. Unterteilung der Gesamtdosis in mehrere kleine Einzeldosen, erholt sich das umliegende gesunde Gewebe besser von den Strahlenschäden als der Tumor (siehe Überblick bei Schmitt, 1998). Weiterhin ist die Wirkung der Strahlentherapie von der Versorgung des Tumors mit Sauerstoff abhängig, was man durch sensibilisierende Substanzen oder O₂-

Einleitung

Überdruckbehandlung beeinflussen kann. Molekularer Sauerstoff kann die Strahlenwirkung verstärken, da sich aus Sauerstoff verstärkt Wasserstoffperoxide bilden und diese dann als eigentliches Mutagen in Aktion treten. Sie oxidieren die Basen der DNA (siehe zusammenfassende Darstellung bei Buchta et al., 2002).

Das Ausmaß der Strahlenschäden am Gewebe und der DNA hängt von der Menge der zugefügten Energie, der Strahlendosis und der Strahlenart ab. Die Energieübertragung ist die Ursache für die biologische Wirkung und für die Strahlenschäden. Ionisierte Strahlen werden zum großen Teil mit Wasser in Wechselwirkung treten, da organische Materie zu 80% aus Wasser besteht. Wasser wird in Hydroxylradikale und Elektronen gespalten, die eine Überlebenszeit von ca. 10^{-6} Sekunden haben. Die weitere Reaktion mit Sauerstoff kann über Perhydroxyradikale zum Hydroperoxid ablaufen. Hydroxylradikale oxidieren organische Verbindungen. Wasserstoffradikale reduzieren organische Verbindungen. Solvatisierte Elektronen können mit anderen Molekülen in Aktion treten, was zu folgenden Ereignissen führen kann. Es können Desaminierungen, Decarboxylierungen, Ringspaltungen, Hydrolysen auftreten, die DNA kann durch Brüche der Base–Zucker–Verbindungen beschädigt werden, es können Zuckermoleküle oxidiert werden und es kommt zu Brüchen in der Nukleotidkette. Klinisch kann es nach Einwirken von ionisierender Strahlung zu akuten Nebenwirkungen an gesundem Gewebe kommen (siehe Zusammenfassung bei Siegenthaler, 2000). Genau an dieser Stelle greift das Amifostin ein, indem es freie Sauerstoffradikale bindet sie damit unschädlich macht (laut Herstellerangaben, Ethyol, Essex Pharma, 1998).

Frühfolgen

Schon während der Behandlung, oder Tage bis Wochen nach Abschluss der perkutanen Strahlentherapie kann es zur akuten Strahlendermatitis (Radiodermatitis acuta), zum Strahlensyndrom (anfangs Schwäche, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, danach Periode des relativen Wohlbefindens) oder zum Strahlenkater (Appetitstörung, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerz, Schwindel) kommen (Ethyol, Essex Pharma, 1998).

Spätfolgen

Durch Veränderung der Mikrovaskularisation können Monate bis Jahre später Veränderungen auftreten, die im betroffenen Körperareal zu einer Atrophie, Degeneration, Fibrosierung oder Nekrose führen und unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen. Blutbildveränderungen, wie z. B. die aplastische Anämie sind ebenfalls häufig, da das Knochenmark durch die Strahlenwirkungen zerstört wird (Bauchinger et al., 1998 und 2001, siehe Zusammenfassung bei Buchta et al., 2002).

1.2.3 Chemotherapie und Zytostatika

Ziel ist die vollständige Eliminierung aller Tumorzellen mit Hilfe von Zytostatika. Durch eine Synchronisierung der Zellen kann eine Optimierung einer Chemotherapie erreicht werden. Die Zellen in der G₀/G₁-Phase sind besonders unempfindlich für Zytostatika, während die Zellen in der S-Phase schnell proliferieren und so empfindlicher auf Zytostatika reagieren (siehe Überblick bei Ethyol, Essex Pharma, 1998).

Zytostatika (z.B. 5-FU, welches bei den Patienten dieser Studie verwendet wurde) sind Hemmstoffe der Zellproliferation, die auf verschiedene Phasen des Proliferationszyklus von Zellen wirken. Ihre Wirkung entfalten sie über eine Hemmung von Zellwachstum und -vermehrung. Davon sind in erster Linie sich schnell teilende Zellverbände oder Gewebe mit hoher Mitoserate betroffen. Die Wirkung kann zusätzlich zur Wachstumshemmung noch zytolytisch sein. Da Zytostatika jedoch nicht nur spezifisch auf Tumorzellen wirken, schädigen sie zusätzlich alle schnell proliferierenden Gewebe eines gesunden Organismus. Es kommt zu Knochenmarksschädigung, Myelosuppression, Immunsuppression, Schädigung der Schleimhäute, des Darmepithels, etc. Gleichzeitig wirken Zytostatika durch Kumulation nephrotoxisch, hemmen die Ovulation und die Spermatogenese und sind zusätzlich teratogen, mutagen, und kanzerogen. Um diese Nebenwirkungen abzuschwächen und selektiv das gesunde, schnell proliferierende Gewebe zu schützen, wird Amifostin eingesetzt (laut Herstellerinformation, Ethyol, Essex Pharma, 1998).

1.2.4 Radiochemotherapie

Unter Radiochemotherapie versteht man das Zusammenwirken von Strahlentherapie und Chemotherapie. Durch die Kombination aus Strahlentherapie und Chemotherapie (Radiochemotherapie) kann der Tumor für die Strahlen sensibilisiert werden. Dies erhöht die Wirksamkeit der Strahlentherapie. Außerdem können so möglicherweise vorhandene Mikrometastasen behandelt werden (siehe zusammenfassende Darstellung bei Buchta et al., 2002).

Das Risiko einer Akut- oder Spättoxizität wird durch die Anwendung einer Radio-/ Chemotherapie allerdings auch erhöht. In einer von Wendt et al. (1998) beschriebenen randomisierten Studie entwickelten 15% der Patienten, die eine Radio-/ Chemotherapie erhielten, eine dosislimitierende Leukopenie Grad 3/4. In einer klinischen Studie wurde die Dosisintensität der Radio-/ Chemotherapie durch unerwünschte Akutwirkungen verringert und die Inzidenz an späten unerwünschten Wirkungen durch eine zusätzliche Anwendung der Chemotherapie erhöht. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Chemotherapie die zytotoxische Wirkung der Strahlung auf gesunde Zellen und auf Tumorzellen verstärken kann (laut Herstellerangaben, Ethyol, Essex Pharma, 1998).

1.3 DNA–Schäden

Durch die Radiochemotherapie wird bekannterweise DNA geschädigt. Dabei kann es an der DNA zu Veränderungen auf zytogenetischer Ebene oder auf molekulargenetischer Ebene kommen. Durch spezielle Färbetechniken können die Schäden auf zytogenetischer Ebene sichtbar gemacht werden. Die Veränderungen auf molekulargenetischer Ebene können mittels PCR nachgewiesen werden. Auf die molekulargenetischen Schäden wurde nicht weiter eingegangen, da der Umfang der Untersuchungen über den Rahmen dieser Studie hinausgehen würde.

Es können unterschiedliche Brüche bzw. Aberrationstypen auftreten. Wenn die beiden Enden eines Chromosoms brechen und sich die neuentstandenen Enden wieder verbinden, entstehen sogenannte Ringchromosomen, zirkuläre Chromosomen (siehe **Abb. 3.15, 3.16, 3.41**). Die distalen Fragmente gehen dabei meist verloren (siehe Zusammenfassung bei Tariverdian und Buselmaier, 1995).

Inversion ist eine Richtungsänderung eines Chromosomenabschnittes um 180° (siehe Zusammenfassung bei Kaiser, 1984). Voraussetzung dafür ist ein Bruch in zwei verschiedenen Bereichen des Chromosoms, gefolgt von der Wiederverbindung des invertierten Abschnittes. Um eine perizentrische Inversion handelt es sich, wenn das Zentromer im Inversionsbereich liegt. Liegt das Zentromer nicht im Inversionsbereich, spricht man von einer parazentrischen Inversion (siehe zusammenfassende Darstellung bei Kaiser, 1984) (siehe **Abb. 1.5, 3.3**).

Eine Translokation bezeichnet den Austausch von Chromosomenanteilen. Verbinden sich jeweils die nicht ursprünglich zusammengehörenden Fragmente der Chromosomen miteinander, so spricht man von einer reziproken Translokation (siehe **Abb. 1.5, 3.1, 3.8, 3.13**). Verbinden sich auf diese Weise zwei Fragmente, die jeweils ein Zentromer besitzen, so ist ein dizentrisches Chromosom entstanden (siehe **Abb. 3.1, 3.5, 3.14**).

Verbinden sich die Fragmente ohne Zentromer, entsteht ein azentrisches Fragment. Azentrische Fragmente haben die Tendenz im Laufe von

Einleitung

Zellteilungen verloren zu gehen (siehe Zusammenfassung bei Körner und Witkowski, 1997).

Brechen 2 oder mehr Chromosomen und kommt es insgesamt zu drei oder mehr Brüchen, handelt es sich um ein komplexes chromosomales Rearrangement (Savage und Simpson, 1994 a, b, siehe **Abb. 3.12, 3.17**).

Mitotische Non-disjunctions sind Fehlverteilungen homologer Chromosomen bei der Mitose (siehe zusammenfassende Darstellung bei Passarge, 2003) (siehe **Abb. 3.2, 3.10, 3.35, 3.36**).

Fehler bei der Replikation von DNA sind unvermeidbar und die Evolution hat ein breites Spektrum an DNA-Reparatur-Genen entwickelt. Durch UV Strahlung induzierte Schäden werden durch ein kooperierendes System verschiedener spezifischer Proteine repariert (siehe Zusammenfassung bei Passarge, 2003). Diese Reparaturmechanismen arbeiten sehr effizient, doch nach *in vivo* Bestrahlung liegen so viele Mutationen vor, dass viele Brüche bestehen bleiben oder Fragmente eines Chromosoms fälschlicherweise mit einem anderen verbunden werden. Es können balancierte oder unbalancierte Translokationen entstehen. Balancierte Aberrationen können klinisch unauffällig sein, während bei einer unbalancierten Aberration Deletionen und Duplikationen auftreten können, die mit dem Leben nicht vereinbar sein können (siehe zusammenfassende Darstellung bei Tariverdian und Buselmaier 1995).

Mit 24-Farben-FISH findet man bei unbestrahlten Patienten in 100 Zellkernen zwischen 0 und 5 chromosomale Bruchereignisse (Kuechler et al., 2002). Nach Bestrahlung steigt die Bruchrate stark an. Dabei scheint die individuelle Strahlensensibilität des einzelnen Menschen stärker ins Gewicht zu fallen als die tatsächlich applizierte Strahlendosis. Verschiedene Forschungsgruppen beschreiben diesen Effekt (Dikomey et al., 1998, Kiltie et al., 1999, Müller et al., 2001). Eine allgemeingültige Aussage darüber, wie viele Bruchereignisse bei welcher Strahlendosis zu erwarten sind, lässt sich nicht treffen.

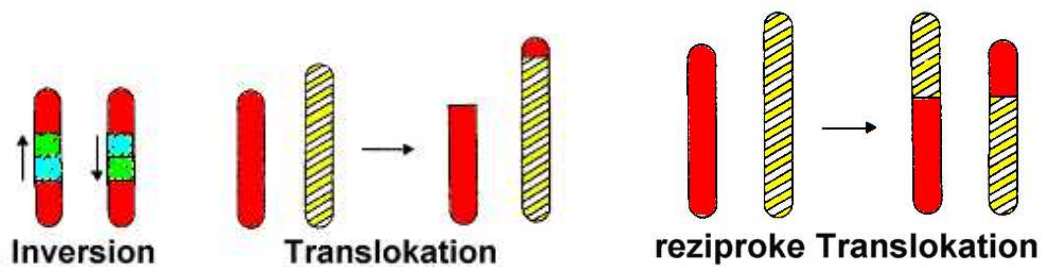


Abb. 1.5 Schematische Darstellung folgender struktureller chromosomaler Aberrationen: Inversion, die einfache Translokation und die reziproke Translokation (Tariverdian und Buselmaier 1995; modifiziert).

1.4 Lymphozyten

Um chromosomale Schäden an der DNA nachweisen zu können eignen sich Lymphozyten sehr gut, da sie leicht zu gewinnen und zu kultivieren sind und es standardisierte Protokolle gibt, um ihre Chromosomen zu isolieren. Desweiteren haben Lymphozyten den Vorteil, dass man an ihnen auch Jahre nach einer Bestrahlung noch chromosomale Schäden nachweisen kann (Schmidberger et al., 2001). Lymphozyten gehören zusammen mit den Granulozyten und Monozyten zu den Leukozyten. Sie stammen genauso wie die Erythrozyten und Thrombozyten von den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab. Lymphozyten werden in sekundären lymphatischen Organen geprägt und dann ins Blut entlassen, wo sie mehrere Jahre überleben können (siehe zusammenfassende Darstellung bei Schmidt und Thews, 1997).

1.5 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Prinzip der FISH–Technik:

Die *in situ* Hybridisierung ist eine geeignete Methode zur Lokalisation von DNA– oder RNA–Sequenzen in Geweben, Zellen und intrazellulären Strukturen oder auf einzelnen Chromosomenbereichen. Im Gegensatz zu anderen Hybridisierungsverfahren (Northern– oder Southern–Blot–Hybridisierung) wird bei dieser Technik das Hybridisierungssignal nicht auf einer festen Trägermembran, sondern direkt im biologischem Material (*in situ*) sichtbar (**Abb. 1.6**, Gall und Pardue, 1969, John et al., 1969). Ursprünglich war nur eine radioaktive Markierung für die Nukleinsäuren und eine Detektion der Hybridisierung über Autoradiographie möglich.

Von Pinkel und Mitarbeitern wurde erstmals 1986 und von Lichter und Mitarbeitern (1988) die Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) an menschlichen Chromosomen beschrieben. Durch die Entwicklung dieser nicht radioaktiven Methode der *in situ* Hybridisierung boten sich eine Reihe von Vorteilen, sowie eine hohe Flexibilität durch viele zur Verfügung stehende Antikörper–Detektionssysteme. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Schnelligkeit, denn Ergebnisse liegen hier schon nach 1–3 Tagen vor.

Bei der FISH werden die DNA Sonden mit einem Fluoreszenzfarbstoff (direkte Methode) oder mit Haptenen, wie Biotin oder Digoxigenin (indirekte Methode) über Polymerase–Kettenreaktion (PCR; Saiki et al., 1986) oder „Nick Translation“ (Rigby et al., 1977) markiert und anschließend denaturiert (DNA liegt dann als Einzelstrang vor). Die zur Hybridisierung verwendeten Objektträger (OT) mit den zu untersuchenden Metaphaseplatten bzw. Interphasekernen werden ebenfalls denaturiert. Die markierte und denaturierte DNA der Sonde lagert sich während der Hybridisierung an homologe DNA–Sequenzen der Ziel–DNA auf dem Objektträger an. Bei der indirekten Methode ist eine anschließende Detektion der mit Haptenen markierten DNA nötig, dies geschieht über Fluoreszenz–markierte Antikörper. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgt an einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan, Zeiss).

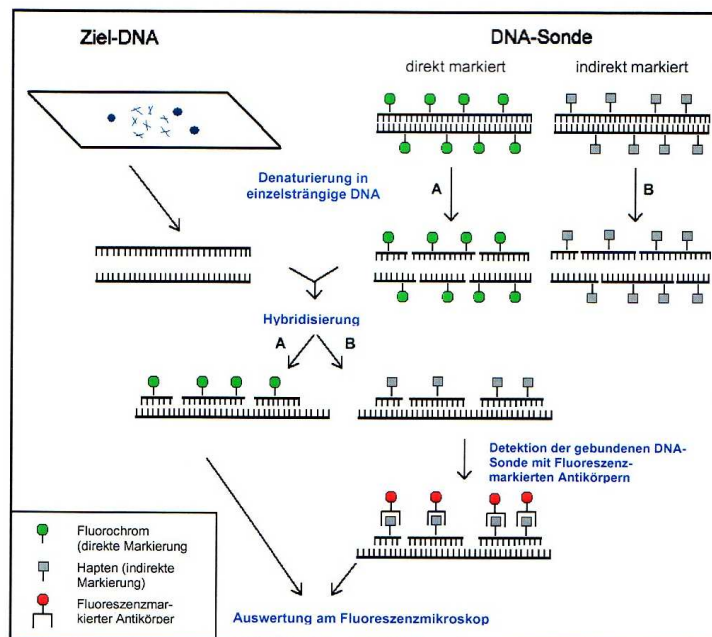


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Prinzips der FISH
 DNA-Sonden werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff (direkte Methode A) oder mit Haptenen, wie Biotin oder Digoxigenin (indirekte Methode B), entweder über PCR mit degenerierten Oligonukleotid-Primern (Telenius et al., 1992) oder über eine Nick-Translation (Rigby et al., 1977) markiert. Dann wird sowohl die Sonden- als auch die Ziel-DNA, welche auf einem Objektträger fixiert ist, durch Hitze-Denaturierung einzelsträngig gemacht. Im anschließenden Hybridisierungsschritt lagert sich die markierte DNA-Sonde an homologe DNA-Sequenzen der unmarkierten Ziel-DNA. Nach direkter Markierung (A) der DNA-Sonde kann die Auswertung der Signale unmittelbar an einem Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Bei der indirekten Methode (B) ist eine vorherige Detektion der mit Hapten markierten DNA mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern nötig (aus Heller, 2003; modifiziert).

Der schon zuvor genannte Vorteil dieser Methode, dass mehrere unterschiedlich markierte Sonden gleichzeitig eingesetzt werden können, hat vor allem im Bereich der Diagnostik den Vorteil, dass mit einem Präparat gleichzeitig Informationen über verschiedene Bereiche des Genoms gewonnen werden können. Dies ist vor allem für die Pränataldiagnostik wichtig, denn hier ist meist nur eine geringe Menge an Untersuchungsmaterial vorhanden. Zusätzlich kann durch den gleichzeitigen Einsatz verschieden markierter Sonden auch Zeit, Arbeitsaufwand und Geld gespart werden.

Einleitung

Heute findet die FISH in der molekularen Zytogenetik und Diagnostik weite Anwendungsfelder wie z. B.:

- 1) Erstellen physikalischer Karten von Chromosomen,
- 2) Analysieren der Chromosomenstruktur und deren Abweichung,
- 3) Untersuchungen zur Struktur, Funktion und Evolution von Chromosomen und Genomen und
- 4) Bestimmung der räumlichen und zeitlichen Expression von Genen.

24-Farben-FISH

In den letzten Jahren fanden eine Vielzahl von Neu- und Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der FISH-Technik für die immer genauere Bearbeitung diagnostischer Fragestellungen statt. So wurde 1989 erstmals die gleichzeitige Darstellung von Zielsequenzen mit 3 Farbstoffen von Nederlof und Mitarbeitern (1989) beschrieben. Eine Weiterentwicklung auf diesem Gebiet führte zur gleichzeitigen Darstellung aller Chromosomen einer menschlichen Zelle in 24 verschiedenen Farben mit nur einer einzigen Hybridisierung (Schröck et al., 1996, Speicher, 1996). Diese Methoden bezeichnet man je nach der Auswertungstechnik als „Spectral Karyotyping“ (SKY) bzw. als „Multiplex-FISH“ (M-FISH). Sie beruhen auf wcp-Sonden (Sonde für ein gesamtes Chromosom, whole chromosome painting). Durch die Markierung der wcp-Sonden mit 5 bis 7 Fluorochromen (Schröck et al., 1996, Speicher und Ward, 1996, Saracoglu et al., 2001) kann für jedes Chromosom eine andere Farbkombination erzeugt werden (24-Farben-FISH, **Abb. 1.7b**, Speicher et al., 1996, Senger et al., 1998). Für ein qualitativ gutes Ergebnis der Hybridisierung ist allerdings die Zugabe von unmarkierter cot1 oder genomischer DNA nötig, die die repetitiven Sequenzen (vor allem in Zentromer- und Heterochromatinbereichen) schon vor der eigentlichen Hybridisierung „abblockt“. Eine zusätzliche Färbung (Gegenfärbung) aller Chromosomen mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI erleichtert das Auffinden der Metaphaseplatten und durch die Erzeugung eines Bandenmusters auch die Identifizierung der Chromosomen (**Abb. 1.7a**). Die Auswertung der Signale erfolgt über eine CCD-Kamera (Lichter, 1997) in

Einleitung

Verbindung mit einem geeigneten Fluoreszenzfilter und Auswertungsprogramm am Computer, um auch Farbstoffe, die für das menschliche Auge nicht sichtbar sind, darstellen zu können (z.B. Infrarotfarbstoffe wie Cy 5 und Cy 5.5). So werden alle 6 Farbkanäle als digitale Bilder gespeichert und können mit der Software ISIS[®] (MetaSystems) ausgewertet werden (Speicher und Eils, 1998). Somit ist es z.B. möglich, die Herkunft von Markerchromosomen, die man häufig in Tumorzellen findet, zu bestimmen oder die an Translokationen beteiligten Chromosomen zu identifizieren. Allerdings ist eine Darstellung von intrachromosomalen Veränderungen mittels 24-Farben-FISH nicht in jedem Fall möglich, da jedes Chromosom mit nur 1 Farbe dargestellt wird. So bleiben z.B. parazentrische und perizentrische Inversionen ohne Verschiebung des Zentromerindexes (siehe zusammenfassende Darstellung bei Kaiser, 1984, Mitelman, 1995) genauso unerkant, wie kleine Duplikationen oder Deletionen.

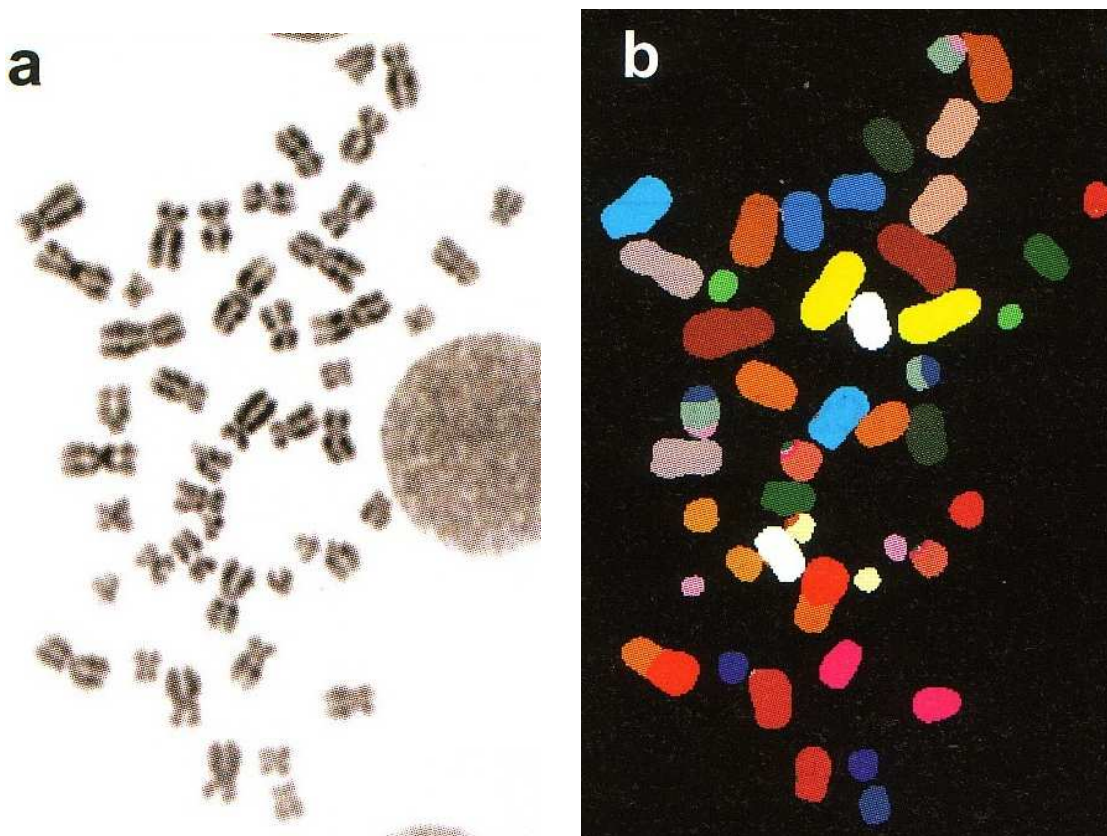


Abb. 1.7 Darstellung einer Metaphase nach DAPI-Färbung und 24-Farben-FISH
a) DAPI-Färbung eines weiblichen Metaphase Kerns.
b) 24-Farben-FISH auf gleicher Metaphase, die in a) dargestellt ist (nach Koehler et al., 1999).

1.6 Zielstellung der Arbeit

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Amifostin als radioprotektives Medikament wirkt (siehe zusammenfassende Darstellung bei Wasserman und Brizel, 2001). Mehrere klinische Studien demonstrierten, dass diese Substanz normales, gesundes Gewebe schützt und Nebenwirkungen, die durch Bestrahlung und Chemotherapie entstehen, im klinisch gewünschten Sinne abschwächt (laut Herstellerangaben Ethyol, Essex Pharma, 1998, Buntzel et al., 1998, Trog et al., 1999 und Wasserman et al., 2000).

Vorherige Studien, die auf die Fähigkeit des Amifostin hinweisen, dass es auch auf das Knochenmark protektiv wirken könnte, bezogen sich bisher hauptsächlich auf die Beschreibung klinischer Symptome (Auletta und Shurin, 1999). Eine schützende Amifostin-Behandlung gegen chromosomale Aberrationen nach Bestrahlung, war bisher nur *in vivo* an Mäusen (Devi et al., 1998), oder an menschlichem Knochenmark unter *in vitro* Bedingungen (List et al., 1998) beschrieben worden. Bisher gab es keine *in vivo* Untersuchungen darüber, ob Amifostin einen Einfluss auf die chromosomalen Veränderungen nach einer Radiochemotherapie in humanen Blutzellen besitzt. Dies ließ die Frage aufkommen, ob der protektive Effekt des Amifostins auch auf genetischer Ebene zu beobachten sei. Untersucht wurden dazu Chromosomen bzw. chromosomale Aberrationen, die auf zytogenetischer Ebene durch 24-Farben-FISH sichtbar gemacht werden konnten. Auf die genetischen Schäden im molekulargenetischen Bereich wurde im Rahmen dieser Studie nicht eingegangen.

Es stellte sich die Frage, ob 2 bis 3 Jahre nach einer Radiochemotherapie mit und ohne Amifostin-Behandlung noch chromosomale Schäden nachgewiesen werden können.

Mit der Bildgebung der 24-Farben-FISH fand sich in einer Kontrollgruppe an nicht bestrahlten Chromosomen eine durchschnittliche Bruchwahrscheinlichkeit von 0,00 – 0,05 Brüchen pro Metaphase (Kuechler et al., 2002). Nach

Einleitung

Radiochemotherapie steigert die Häufigkeit der chromosomalen Brüche, je nach individueller Strahlenempfindlichkeit der einzelnen Patienten, stark an (Dikomey et al., 1998, Kiltie et al., 1999, Müller et al., 2001). Fänden sich in Lymphozyten von Patienten Jahre nach Behandlung mit Amifostin keine chromosomalen Schäden, so könnte dies darauf hinweisen, dass die Wirkungsweise des Amifostins nicht nur in der Abschwächung bestrahlungsbedingter klinischer Nebenwirkungen zu sehen ist. Ob dann die genetische Auswirkung der Amifostin-Behandlung nach Radiochemotherapie die gewünschte Wirkung der Radiochemotherapie selbst im klinisch gewünschten Sinne unterstützt oder gar abschwächt, bliebe neu zu diskutieren.

Wenn chromosomale Residualschäden nachzuweisen sind, muss analysiert und beschrieben werden, um welche Art von Schäden es sich handelt. Sind es – wie zu erwarten – die bekannten Aberrationsformen wie z. B.: Translokationen, dizentrische Chromosomen und andere, von denen bekannt ist, dass sie Jahre überdauern können, oder sind es Aberrationsformen, die lediglich nach akuter Bestrahlung gefunden werden (Körner und Witkowski, 1997)?

Es gilt auch zu differenzieren, ob die gefundenen Schäden auf die Radiochemotherapie zurückzuführen sind, oder durch die Kultivierung der Lymphozyten bei der Chromosomenpräparation entstanden sind. Viele azentrische Chromosomenfragmente könnten auf kulturbedingte Schäden hinweisen, da zu erwarten ist, dass sie eigentlich im Laufe der Zeit „verloren“ gehen (siehe Zusammenfassung bei Bauchinger et al., 1998, Körner und Witkowski, 1997).

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob es einen Unterschied in der Häufigkeit oder in der Verteilung der unterschiedlichen chromosomalen Aberrationen zwischen den beiden unterschiedlich behandelten Patientengruppen gibt.

Einleitung

Ein protektiver Effekt des Amifostins auf chromosomaler Ebene wäre durch signifikant weniger chromosomale Schäden in der mit Amifostin behandelten Patientengruppe nachzuweisen. Allerdings wäre dann auch die therapeutische Wirksamkeit von Amifostin – wie erwähnt – neu zu diskutieren, denn das Ziel der Radiochemotherapie ist ja die Zerstörung von Zellen, die nach bisherigen Vorstellungen über induzierte Schäden des genetischen Materials erzielt werden.

Käme es in der mit Amifostin behandelten Patientengruppe zu einem deutlichen Anstieg der Aberrationshäufigkeit, könnte es daran liegen, dass unter Amifostingabe Zellen überleben, die normalerweise der Apoptose unterliegen. Eine Reduzierung des apoptotischen Zelltods nach Radiochemotherapie unter Amifostingabe ist bei Provinciali et al. (1999) und Bisht et al. (2000) beschrieben.

Aufgrund dieser Überlegungen wurde der Versuchsaufbau wie folgt festgelegt.

In dieser Studie wurden Chromosomen von Patienten untersucht, die sich einer Radiochemotherapie unterzogen hatten und von denen einige während der Behandlung Amifostin erhielten und andere nicht. Es handelte sich um eine retrospektive, nicht randomisierte Studie, die im Blindversuch durchgeführt wurde.

Die aus Lymphozyten gewonnenen Metaphasechromosomen wurden mit 24-Farben-FISH markiert und die gefundenen chromosomalen Aberrationen dokumentiert. Anschließend erfolgte der Vergleich der chromosomalen Aberrationen zwischen den mit und ohne Amifostin behandelten Patientengruppen.

Material und Methoden

2.1 Patienten und Therapieschema

Im Strahlentherapiezentrum der Martin–Luther–Universität in Halle–Wittenberg wurden zwischen September 1997 und Oktober 1998 30 Patienten mit postoperativer Radiochemotherapie wegen eines Rektumkarzinoms in eine offene Phase–II–Studie eingebracht. Alle Patienten hatten eine operative Entfernung (R0) des Tumors hinter sich. Das Durchschnittsalter lag bei 58 Jahren (von 52 Jahren bis 72 Jahren). Die Bestrahlung des Beckens erfolgte mit insgesamt 50,4 Gy. Die Radiochemotherapie erfolgte in 28 Fraktionen großvolumig mit 1,8 Gy in Drei–Felder–Technik, drei Fraktionen Boost auf Sakrum und Präsakralregion, zwei Kurse 5–FU mit 1000 mg/m² pro Tag als 120–Stunden–Dauerinfusion in Woche 1 und 5. Amifostin wurde 15 Patienten nur an den Chemotherapie Tagen 1 bis 5 und 29 bis 33 in einer Dosis von jeweils 500 mg/d (das entspricht ca. 300 mg/m²) direkt vor der täglichen Bestrahlung intravenös appliziert. Gleichzeitig wurden die 15 anderen Patienten der identischen Radiochemotherapie unterzogen, aber nicht mit Amifostin behandelt. Sie dienen als nicht randomisierte Kontrollgruppe. Die Studie war freiwillig, und den Patienten war das Therapieschema freigestellt. Die Zustimmung der Ethikkommission der Martin–Luther–Universität aus Halle–Wittenberg war vorhanden (Dunst et al., 2000). Die Behandlung erfolgte nach den Empfehlungen der Deutschen Krebsgesellschaft. Alle Patienten beendeten die Therapie ohne Komplikationen oder ungeplante Unterbrechungen (Dunst et al., 2000) und befanden sich zum Zeitpunkt der vorliegenden Studie in kompletter Remission (Kuechler et al., 2003). 12 der Patienten stimmten zu, an dieser zusätzlichen Studie zur Untersuchung der chromosomalen Schäden 2–3 Jahre nach der Therapie teilzunehmen.

2.1.1 Blutproben der 12 Patienten

Tab. 1 Diagnosen der einzelnen Patienten

Patient	Karzinom	Staging	Grading
Patient 1	AdenoCA Rektum	T3, N2, M0	G3
Patient 2	Tubuläres AdenoCA des Rektums	T3, N0, M0	G2
Patient 3	AdenoCA Rektum	T3, N0, M0	G2
Patient 4	Tubuläres AdenoCA des Rektums	T2, N2, M0	G2
Patient 5	Adenosquamöses RektumCA	T3, N0, M0	G2
Patient 6	AdenoCA Rektum	T3, N0, M0	G2
Patient 7	Tubuläres AdenoCA des Rektums	T3, N0, M0	G3
Patient 8	AdenoCA Rektum	T3, N0, M0	G2
Patient 9	AdenoCA Rektum	T3, N0, M0	G2
Patient 10	Tubulopapilläres RektumadenoCA	T3, N1, M0	G3
Patient 11	Tubuläres AdenoCA des Rektums	T3, N0, M0	G2
Patient 12	Tubuläres AdenoCA des Rektums	T4, N1, M0	G2

Tab. 2 Zeitraum zwischen Therapie und vorliegender Studie (Post RTC), Alter der Patienten und Amifostingabe

Patient	Post RCT	Alter	Amifostin
P1	27 Mon	61 J	500 mg/d
P2	31,5 Mon	70 J	500 mg/d
P3	29,5 Mon	52 J	–
P4	28,5 Mon	67 J	500 mg/d
P5	26,5 Mon	59 J	500 mg/d
P6	38 Mon	62 J	–
P7	30 Mon	72 J	500 mg/d
P8	30 Mon	57 J	500 mg/d
P9	30,5 Mon	58 J	–
P10	33 Mon	64 J	–
P11	30 Mon	68 J	500 mg/d
P12	32 Mon	52 J	–

In **Tab. 1** und **2** sind die 12 Patienten aufgelistet. Es wurde dargestellt, wie viele Monate nach der Radiochemotherapie ihre Chromosomen untersucht wurden (Post RCT), wie alt sie zum Zeitpunkt der Studie waren, wieviel Amifostin sie intravenös appliziert bekamen und an welchem Tumor sie litten. Das Blut von diesen 12 Patienten wurde kultiviert und auf chromosomale Schäden untersucht.

2.1.2 Kultivierung der Blutproben

Standard Protokoll nach Verma und Babu (1989)

Lymphozytenanzucht

Reagenzien

RPMI 1640

Wachstumsmedium mit Glutamax: L-Alanin und L-Glutamin (Gibco)
+Fetales Kälberserum (Seromed) 12 %
+Penicillin (100.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 U/ml) (Seromed) 1 %

Phytohämagglutinin (PHA)	Lyophilisiert, (Seromed) in 5 ml Aqua dest. lösen, aliquotieren zu 1 ml, bei -20°C lagern
Ethidiumbromid	10 mg/ml, (Serva)
Colcemid-Lösung	10 µg/ml, (Seromed)
Fixativ	Eisessig (Merck) : Methanol (Merck) = 1 : 3 bei 4°C
Hypotone Kaliumchlorid Lösung	0,559 g KCl / 100 ml Aqua dest., KCl (Merck) 0.56 %
Patientenblut	10 ml heparinisiertes Vollblut

Material

Sterile Gewebekulturflaschen für Suspensionskulturen mit schrägem Hals (Greiner®)

Material und Methoden

Seidenpapier

Objektträger (OT, Menzel–Superfrost)

Kulturansatz

In sterile Gewebekulturflasche (50 ml) wurde eingefüllt:

–10 ml RPMI

–0,1 ml Phytohämagglutumin

–1,0 ml Vollblut

Anschließend erfolgte die Inkubation für 72 h bei 37°C im geschlossenen System.

2.1.3 Chromosomenpräparation

Während der letzten 1,5 h Kulturdauer Inkubation mit Colcemid

0,1 ml (10 mg/ml) Colcemid 0,1 µg/ml

Aufbereitung

–Aufschütteln der Zellkultur (ZK)

–Überführung der ZK in Zentrifugenröhrchen (14 ml Spitzröhrchen–Falcontubes)

–Zentrifugation 5 min bei 1500 U/min

–Überstand–Medium mit Wasserstrahlpumpe absaugen

–10 ml hypotone Kaliumlösung auf den Rückstand geben und gut resuspendieren

–20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubieren

–Anfixieren durch Zugabe von 1 ml Fixativ

–Zentrifugation 5 min bei 1500 U/min

Waschen

4x –Überstand abnehmen + 10 ml Fixativ 4°C

–Zentrifugation 5 min bei 1500 U/min

Material und Methoden

Nach letztem Waschschrift den Überstand absaugen und in ca. 1 ml Fixativ aufnehmen. Die Menge des Fixativs ist abhängig von der Menge des Sediments, nach Zugabe sollte die Suspension leicht trüb sein.

Auftropfen der Zellsuspension

- OT mit Seidenpapier reinigen und anschließend in Aqua dest. (4°C) im Kühlschrank bis zum Auftropfen aufbewahren
- 1 bis 3 Tropfen der Suspension mit einer Glas-Pipette auf OT auftropfen
- OT zum Abtropfen schräg stellen, evtl. mit einem Tropfen Fixativ das Restplasma abspülen
- OT bei +50°C auf der Heizplatte trocknen
- OT je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe ziehen (70 %, 95 %, 100 %)
- Lufttrocknen
- Über Nacht bei RT altern lassen, oder am Tag der Färbung den OT bei 90°C für 1 h im Trockenschrank altern.
- OT kann bei Raumtemperatur ca. 2 Wochen gelagert werden und sollte zur weiteren Lagerung bei -20°C eingefroren werden.

Für spätere Nachuntersuchungen wird die restliche Lymphozytensuspension in Fixativlösung bei -20°C gelagert.

2.1.4 Aufbereitung des Objektträgers

Reagenzien

cot1	75 ml cot1 DNA (1 mg/ml, Gibco BRL) 150 ml 100% Ethanol 1 h in der Wärmezentrifuge (Speed vac, Savant) bei mittlerer Geschwindigkeit, Lagerung bei -20°C
DAPI Herstellung	1000 ml Vectashield® 4 µl DAPI-Stammlösung (Sigma, 50 mg/ml), bei 4°C lagern

Material und Methoden

Dextransulfat	2 g Dextransulfatpulver (Sigma) 2 ml SSC 2 ml 0,5 m Na-Phosphat (Merck) auf 10 ml mit Aqua dest. auffüllen, bei 70°C ca. 2 h lösen Gebrauchslösung 1:1 mit deionisiertem Formamid verdünnen
70 % Formamid	140 ml Formamid + 20 ml 20 × SSC + 40 ml Aqua dest. mit 1 n HCl 7–7,5 einstellen
Marvellösung	0,25 g Marvel® = Trockenmilch in 5 ml 4 × SSC/Tw lösen und abzentrifugieren
2 × PBS	PBS Dulbecco (9,55 g/l, Seromed) in Aqua dest.
Pepsin-Lösung	1 % 1 N HCl 0,5 % Pepsin-Stammlösung (1 g Pepsin in 50 ml Aqua dest., Sigma) in Aqua dest.
Postfix-Lösung	Paraformaldehyd + 450 ml 1 × PBS + 50 ml MgCl ₂
20 × SSC	87,65 g NaCl (Roth) 44,10 g Natriumcitrat (Merck) ad 500 ml Aqua dest. mit 1 n HCl pH 7–7,5 einstellen
4 × SSC/Tw	100 ml 20 × SSC + 400 ml Aqua dest. + 250 ml Tween® 20 mit 1 n HCl pH 7–7,5 einstellen

Paraformaldehyd Vorbehandlung

Um die Chromosomen zu härten.

–OT 5 min in 2 × SSC waschen

–OT 10 min in Formalin (50 ml 1 × PBS + 1,5 ml Formaldehyd 37 %)

–OT 1 min in 2 × PBS inkubieren

Pepsinbehandlung des OT

Nach Fixation der Zellen auf dem OT, Durchführung des Pepsinverdaus, um eine optimale Hybridisierung der Chromosomen zu erzielen.

- 100 ml einer 10 mM HCl in einer Küvette im Wasserbad auf 37°C erwärmen
- 500 ml Pepsinstammlösung (20 mg/ml) zur HCl Lösung geben
- OT für 5 min in der Lösung inkubieren
- OT bei Raumtemperatur für 5 min in 1 × PBS waschen

Postfixieren

- OT bei RT für 10 min mit 100 ml einer 1 %igen Formaldehydlösung (gelöst in 1 × PBS mit 50 mM MgCl₂) inkubieren
- OT bei RT für 5 min in 1 × PBS waschen
- OT je 3 min in aufsteigender Ethanolreihe (70 %, 95 %, 100 %) dehydrieren
- Lufttrocknen

2.1.5 Denaturierung des OT

Damit die DNA auf dem OT einzelsträngig vorliegt.

- OT auf Heizplatte bei 72°C vorwärmen
- 100 µl 70 % Formamid auf Deckglas geben und damit OT abdecken
- OT für 3 min auf der Heizplatte denaturieren
- Deckglas entfernen, OT in 70 % Ethanol (–20°C) für 3 min dehydrieren
- OT bei RT für je 3 min in 95 % und 100 % Ethanol dehydrieren
- Lufttrocknen

2.1.6 Färbung mit M–FISH

Präparation der M–FISH Sonden

- 24–Farben DNA–Sonden mix in 24 µl Dextransulfat lösen und mit 50 µg cot1 abblocken, um unspezifische Hintergrundsignale zu vermeiden.

Material und Methoden

- Sonde prähybridisieren (Denaturierung für 5 min bei 75°C, anschließende Inkubation bei 4°C, damit sich die DNA nicht wieder aneinander lagert. Bei der langsamen Erwärmung lagert sich nun das cot1 an.)
- 12 µl Sonden–DNA für einen halben OT (24 × 24 Deckglas)
- OT mit Deckglas luftblasenfrei abdecken und mit Fixogum (Marabu®) umranden
- OT für 3 Tage bei 37°C in einer feuchten Kammer hybridisieren

Detektion im Dunklen

- Deckglas vorsichtig entfernen
- OT 3 × 5 min bei 42°C in 50 % Formamid inkubieren
- OT 3 × 5 min bei 42°C in 2 × SSC waschen
- OT 1 × 5 min bei RT in 4 × SSC/TW
- 100 ml Marvel® für 15 min bei 37°C (Abblocken unspezifischer Bindungsstellen)
- kurz in 4 × SSC/TW waschen

1. Schritt

für einen OT:

- 7 µl anti–Digoxigenin–Cy 5,5 und 0,7 µl Avidin–Cy 5 in 43 µl Marvel® auf OT auftragen
- OT mit Deckglas luftblasenfrei abdecken
- für 45 min bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren
- 2 × 4 min bei RT in 4 × SSC/TW waschen

2. Schritt

- 5 ml anti–mouse Digoxigenin und 0,5 ml biotinyliertes anti–Avidin in 45 ml Marvel® auftragen
- OT mit Deckglas luftblasenfrei abdecken
- für 30 min bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren
- 2 × 4 min bei RT in 4 × SSC/TW waschen

3. Schritt

- 7 µl anti-Digoxigenin-Cy 5,5 und 0,7 µl Avidin-Cy 5 in 43 µl Marvel® auf OT auftragen
- OT mit Deckglas luftblasenfrei abdecken
- für 45 min bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren
- 1 × 4 min bei RT in 4 × SSC/TW waschen
- 1 × 4 min bei RT in 1 × PBS waschen
- mit Aqua dest spülen
- je 3 min in aufsteigender Alkoholreihe dehydrieren (70 %, 95 %, 100 %)
- Lufttrocknen im Dunklen

Gegenfärbung

- 20 ml DAPI-Lösung auf OT, möglichst blasenfrei mit einem Deckglas abdecken
- OT im Dunklen bei 2-5°C lagern

2.1.7 Labelschema

Chr.	FITC	Spectrum Orange	Texas Red	Cy 5 bio	Cy 5.5 dig
1				Yellow	
2					Blue
3			Red		
4	Green				
5		Orange			
6	Green			Yellow	
7				Yellow	Blue
8			Red	Yellow	
9		Orange		Yellow	
10	Green				Blue
11	Green		Red		
12	Green	Orange			
13			Red		Blue
14		Orange			Blue
15		Orange	Red		
16	Green			Yellow	Blue
17	Green		Red	Yellow	
18	Green	Orange		Yellow	
19			Red	Yellow	Blue
20		Orange		Yellow	Blue
21		Orange	Red	Yellow	
22	Green		Red		Blue
X	Green	Orange			Blue
Y		Orange	Red		Blue

Abb. 2.1 Labelschema der jeweiligen Chromosomen 1–22, X und Y

Die Chromosomen 1–5 sind jeweils mit einer Farbe markiert worden, die Chromosomen 6–15 mit jeweils zwei verschiedenen Farben und die Chromosomen 16–22, X und Y mit drei unterschiedlichen Farben. So ergibt sich für jedes einzelne Chromosom ein ganz individuelles Farbspektrum (Senger et al., 1998).

Für die Erzeugung von 24 unterschiedlichen Farben benötigt man mindestens 5 verschiedene Fluorochrome. Jede der 24 verschiedenen Chromosomen-spezifischen „painting“ Sonden wird dabei mit einer unterschiedlichen Kombination von Fluorochromen markiert (Senger et al., 1998). In **Abb. 2.1** ist das Labelschema dargestellt, nach dem die Chromosomen in dieser Studie markiert wurden.

2.1.8 Graphische Darstellung der Chromosomen

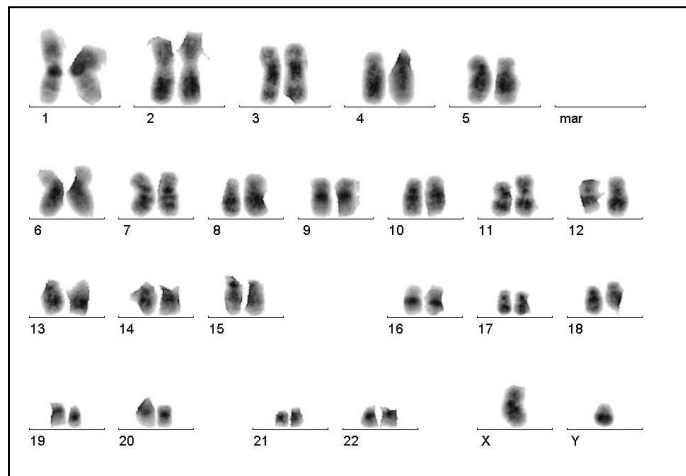


Abb. 2.2 Darstellung männlicher Metaphase Chromosomen im Karyogramm (P8 MP013). Invertiertes Bild bei DAPI-Färbung.

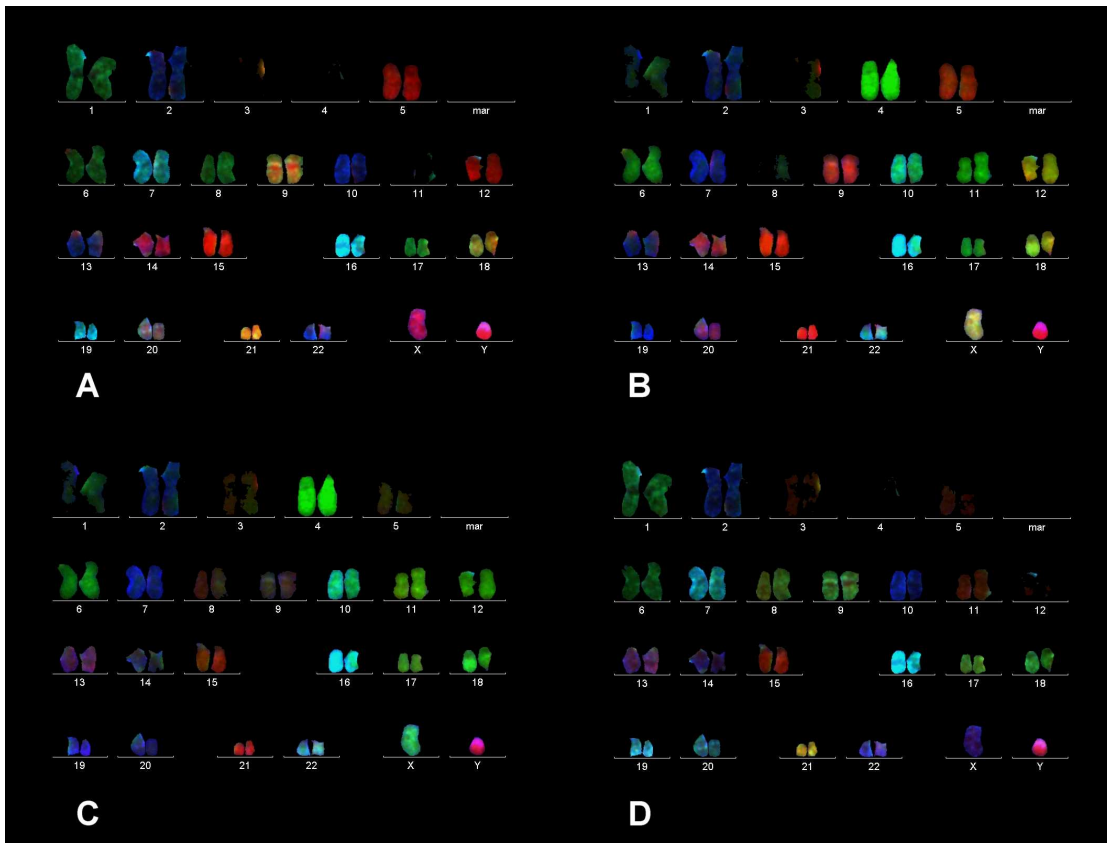


Abb. 2.3 Darstellung einer Metaphase nach Färbung mit 24-Farben-FISH und Auswertung mit ISIS-Software (Metasystems, Altlußheim, Germany). Jedes Chromosom erhält seine individuelle Farbe, siehe Labelschema (**Abb. 2.1**). Je nachdem mit welcher Farbkombination das Karyogramm betrachtet wird, ergeben sich unterschiedliche Farben für die einzelnen Chromosomen. Gäbe es z. B. eine Translokation zwischen den Chromosomen 11 und 12, wäre diese in **C** nicht zu erkennen, in **A**, **B** und **D** allerdings schon. Darum ist es wichtig, immer die verschiedenen Farbkombinationen einer Metaphase zu untersuchen.

A Spektrum Orange, Cy 5, Cy 5,5
C FITC, Texas Red, Cy 5,5

B FITC, Spektrum orange, Cy5,5
D Texas Red, Cy 5, Cy 5,5

2.1.9 Falschfarben

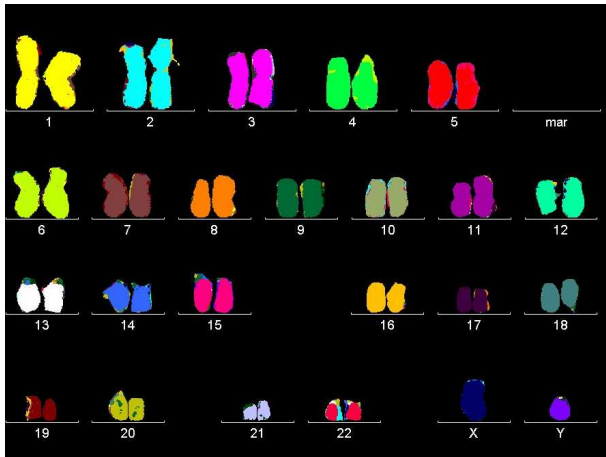


Abb. 2.4 Karyogramm der Metaphase P8MP013 in Falschfarben dargestellt. Jedes der einzelnen Chromosomen erhält seine eigene spezifische Färbung. Die verwendete Falschfarbendatei HURRA 2 ist in **Abb. 2.5** abgebildet.

HURRA2			
	1		13
	2		14
	3		15
	4		16
	5		17
	6		18
	7		19
	8		20
	9		21
	10		22
	11		X
	12		Y

Abb. 2.5 HURRA 2 Darstellung der Falschfarben, die für alle untersuchten Metaphasen dieser Studie verwendet wurde. Links sind die Farbzusammenordnungen der jeweiligen Chromosomen (1–22, X und Y) zu sehen.

Durch die ISIS[®] mFISH Software wird in jedem Pixel die Bildinformation aller Fluoreszenzfarbstoffe nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ analysiert. Entsprechend der Kombination unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb der einzelnen Bildpunkte (ohne Berücksichtigung von DAPI) wird in einem ausgewählten Karyogramm die spezifische Farbcodierung für jedes Chromosom ermittelt und von ISIS[®] als so genannte Falschfarbe in einem Farb-Klassifikator gespeichert (Senger et al., 1998). Die Metaphasen in dieser Studie wurden mit der in **Abb. 2.5** dargestellten Falschfarbendatei HURRA2 analysiert.

2.2 Auswertung

2.2.1 Aufnahmen der Mitosen und Bearbeitung

Die Präparate wurden am Axioplan 2 Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss) mit einem Fünffachfilterrad ausgewertet, welches die Aufnahme von DAPI, FITC, Spectrum Orange, Texas Red, Cy 5 und Cy 5,5 nacheinander ermöglicht. Über eine CCD-Kamera (IMAC®) wurden die einzelnen Metaphasen in den 6 verschiedenen Fluoreszenzen als digitale Bilder aufgenommen und an den Computer weitergeleitet. Die Verarbeitung der Metaphasen erfolgte mit der Software ISIS® mFISH von MetaSystems (Altlussheim, Deutschland). Die Chromosomen wurden virtuell ausgeschnitten und in einem Karyogramm sortiert. Die so dargestellten strukturellen und numerischen Aberrationen wurden notiert und analysiert.

2.2.2 Analyse der Chromosomen und ihrer Schäden

In einem Blindversuch wurden ca. 130 Metaphasen pro Patient aufgenommen. Metaphasen mit offensichtlich präparationsbedingtem unvollständigem Chromosomensatz oder schlechter Farbqualität wurden aussortiert. Pro Patient wurden genau 100 Metaphasen auf chromosomale Schäden untersucht.

Die Klassifikation der einzelnen Aberrationen erfolgte nicht nach der ISCN-Nomenklatur, sondern entsprechend der strahlenbiologischen Auswertung. Die festgestellten Aberrationen wurden beschrieben und nach folgendem Schema klassifiziert (Kuechler et al., 2002):

Brüche, azentrische Fragmente, reziproke Translokationen, nicht-reziproke Translokationen, komplexe chromosomale Rearrangements, Ringchromosomen, Inversionen und Insertionen.

Jeder Farbwechsel im Chromosom wurde als Bruch registriert. Bei einfachen Translokationen wurde definiert, dass sie Material von zwei verschiedenen Chromosomen beinhalten, mit je einem Bruch pro Chromosom. Komplexe

chromosomale Rearrangements bestehen aus mindestens zwei Chromosomen mit zusammen drei oder mehr Brüchen (Savage und Simpson, 1994 a, b). Dizentrische Chromosomen und Ringchromosomen konnten leicht mit Hilfe der DAPI-Färbung identifiziert werden.

2.2.3 Statistik

Als Anzahl der Brüche in den Aberrationen wurde immer die minimale Bruchmenge angenommen, die gerade ausreicht, um die jeweilige Aberration entstehen zu lassen. Die Summe aller Brüche in allen Metaphasen eines Patienten wurden durch die Anzahl der untersuchten Metaphasen geteilt, um die Bruchrate pro Mitose (B/M) der einzelnen Patienten miteinander vergleichen zu können. Die Brüche pro Mitosen und die Mitosen mit chromosomalen Aberrationen wurden zwischen der Patientengruppe mit der Amifostin-Behandlung und den Patienten ohne Amifostin-Behandlung verglichen. Da es sich nicht um eine Normalverteilung der Gruppen handelte, wurde als nichtparametrischer Test der Mann-Whitney-U Test durchgeführt (siehe **Abb. 3.51**). Das Signifikanzniveau war auf $p < 0,05$ festgelegt.

Des Weiteren wurden die Doppelstrangbrüche, die einfachen und reziproken Translokationen, die Inversionen zusammen mit den Ringchromosomen, sowie die dizentrischen Chromosomen und die komplexen chromosomalen Rearrangements in den beiden unterschiedlichen Patientengruppen verglichen. Aufgrund der geringen Probenzahl ($n=12$) wurde jeweils der Mittelwert und der Standardfehler berechnet und dargestellt (siehe **Abb. 3.52 a-f**).

Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der klinischen Fälle

Nach Untersuchung von 100 Metaphasen (MP) je Patient konnten folgende chromosomale Residualschäden beschrieben werden. Die unterschiedlichen Aberrationsformen der Patienten sind in den Tabellen 3–14 zusammengefasst.

Patient 1, mit Amifostin–Behandlung

In 22 Metaphasen (MP) traten chromosomale Aberrationen auf. Das Chromosom (#) 22 erschien in 7 MP vergrößert. Das #Y lag in einer MP doppelt vor (**Abb. 3.2**). Die komplexen Rearrangements sind in kursiv gedruckt, die fettgedruckten Aberrationen sind in **Abb. 3.1–3.6** dargestellt.

Tab. 3 Chromosomale Aberrationen von Patient 1

Reziproke Translokationen	Translokationen	Dizentrische Chromosomen	Einfache Brüche	Andere Aberrationstypen
tr(3;16)	<i>t(1*;5) + t(1*;8)</i>	dic(3;11)	B“ 12	Inversionen
tr(9;20)	+ <i>t(X*;8)</i>	dic(11;20)	B“ 11	inv #11
tr(2;19)	<i>t(4*;14) + t(1;8*)</i>	dic(9;18)	B“ 9	inv #3
tr(7;14)	+ <i>t(4;8*)</i>	dic(16;18)	B“ 4	inv #2
tr(1;2)	t(X;2*) +	dic(4;10)	B“ 6	
tr(5;9)	t(2;10*)	dic(11;19)		Insertionen
tr(1;4)	<i>t(19;16*;19)</i>			ins(4*;15)
tr(15;16)	t(2;12*)	<i>dic(4;21)</i>		
tr(X;2)	t(1;20*)	<i>(#4 ist 2 x gebrochen)</i>		
	t(13;21*)			
	t(11;17*)			
	t(X;13*)			
	t(1;12*)			

Ergebnisse

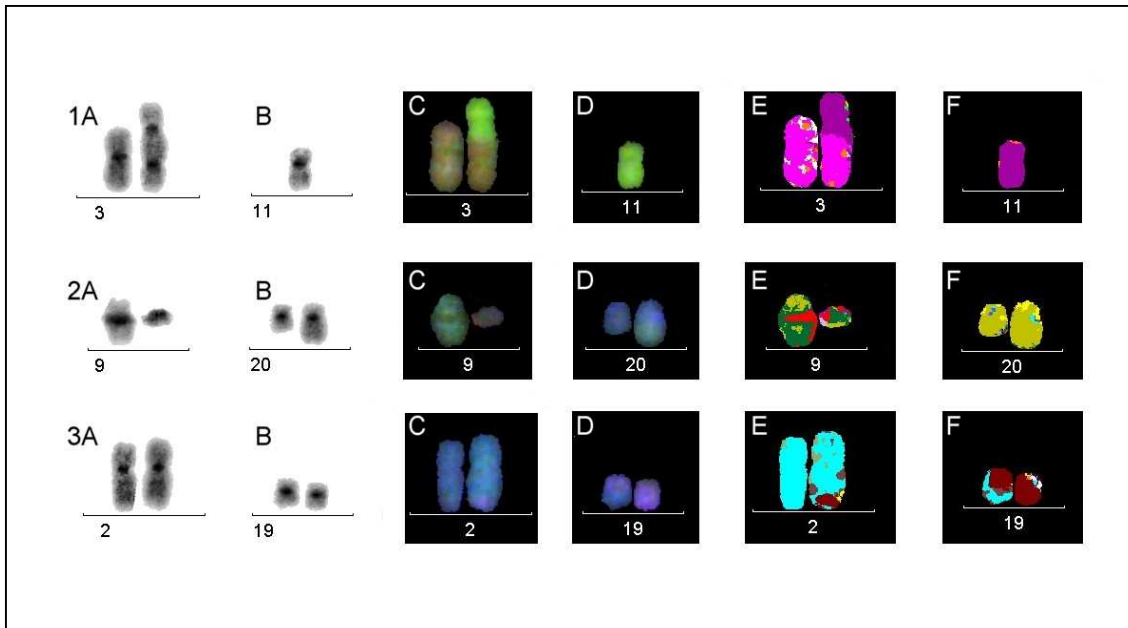


Abb. 3.1 Patient wurde mit Amifostin behandelt.

- 1 A-F Zeigt ein dizentrisches Chromosom (#), die azentrischen (ace) Fragmente fehlen. dic(3;11), ace 3,11 fehlen
 A und B zeigen die # 3,11 in der invertierten DAPI Färbung.
 C und D stellen die # 3,11 in der Farbkombination FITC, TR, Cy5.5 dar.
 E und F Darstellung der # 3,11 als Falschfarbendatei HURRA 2.
- 2 A-F Zeigt eine reziproke Translokation, tr(9;20)
 A und B zeigen die # 9,20 in der invertierten DAPI Färbung.
 C und D stellen die # 9,20 in der Farbkombination FITC, TR, Cy5.5 dar.
 E und F Darstellung der # 9,20 als Falschfarbendatei HURRA 2.
- 3 A-F Zeigt eine reziproke Translokation, tr(2;19)
 A und B zeigen die # 2,19 in der invertierten DAPI Färbung.
 C und D stellen die # 2,19 in der Farbkombination FITC, TR, Cy5.5 dar.
 E und F Darstellung der # 2,19 Falschfarbendatei HURRA 2.

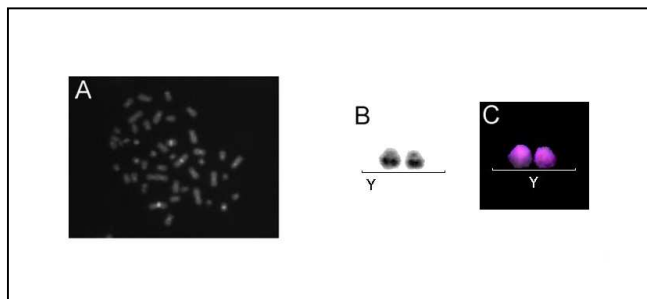


Abb. 3.2

Non-disjunction des Y Chromosoms, mit Amifostin behandelter Patient.

- A Gesamte Metaphase in der DAPI Färbung.
- B Invertiertes DAPI Bild des #Y.
- C #Y dargestellt in der Farbkombination FITC, TR, Cy5.5.

Ergebnisse

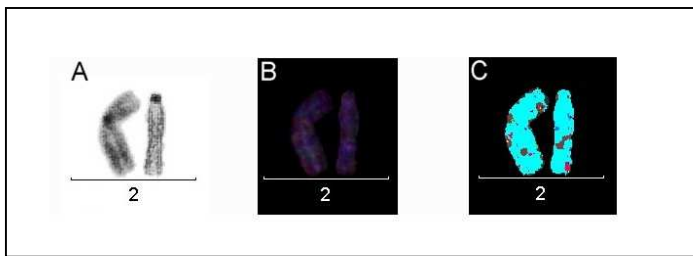


Abb. 3.3

Invertiertes Chromosom 2, Pat. mit Amifostin behandelt.

- A #2 in der invertierten DAPI Färbung.
- B #2 dargestellt mit der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5.
- C Darstellung des #2 als Falschfarbendatei HURRA 2.

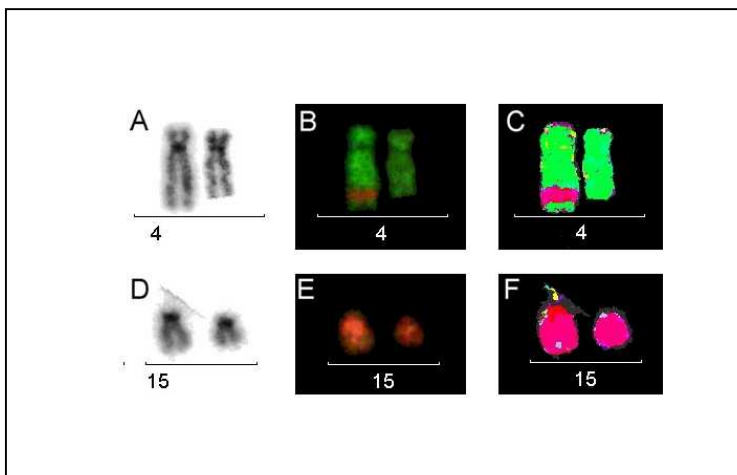


Abb. 3.4

Insertion eines chromosomalen Anteils (#15) in ein anderes Chromosom (#4).
Ins(4*;15)

- A #4 in der invertierten DAPI Färbung dargestellt.
- B #4 dargestellt mit der Farbkombination FITC, SpO und Cy5.5.
- C Darstellung des #4 als Falschfarbendatei HURRA 2.
- D #15 in der invertierten DAPI Färbung dargestellt.
- E #15 dargestellt mit der Farbkombination FITC, SpO und Cy5.5.
- F Darstellung des #15 mit der Falschfarbendatei HURRA 2.

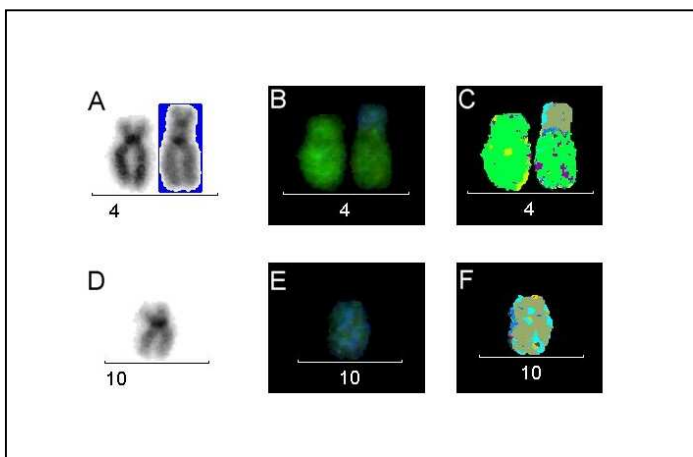


Abb. 3.5

Darstellung eines dizentrischen Chromosoms, ohne azentrische Fragmente.

dic(4;10), ace 4,10 fehlen

- A #4 in der invertierten DAPI Färbung dargestellt. Das rechte Chromosom ist dizentrisch.
- B Darstellung in der Farbkombination FITC, Tr und Cy5.5.
- C Darstellung der Chromosomen mit der Falschfarbendatei HURRA 2.
- D #10 in der invertierten DAPI Färbung dargestellt.
- E #10 dargestellt in der Farbkombination FITC, Tr und Cy5.5.
- F Darstellung des #10 mit der Falschfarbendatei HURRA 2.

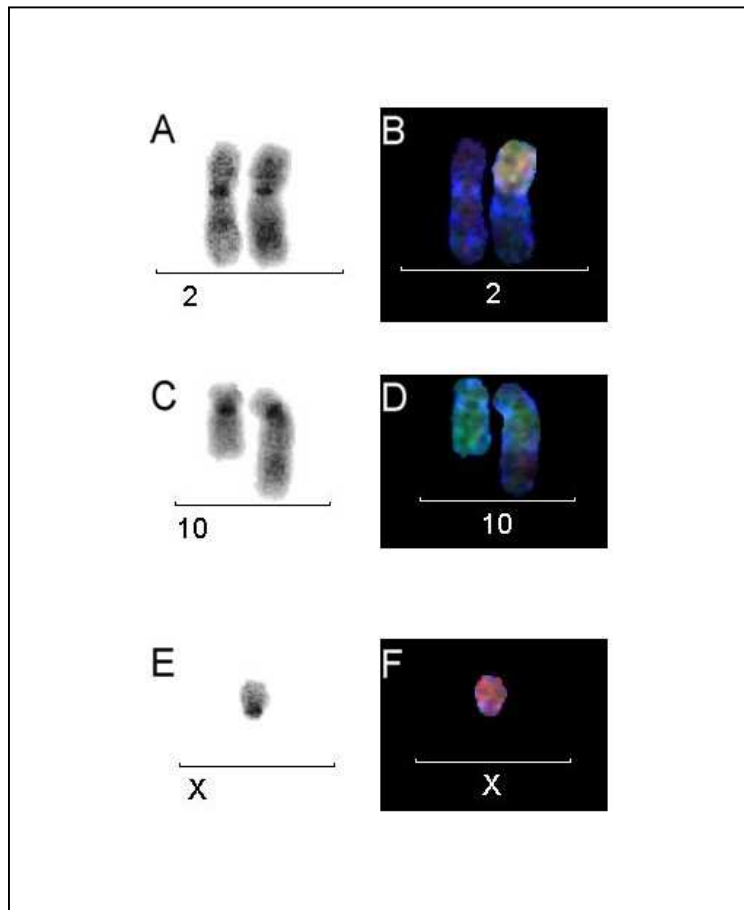


Abb. 3.6 Der Patient wurde mit Amifostin behandelt. Darstellung eines komplexen chromosomalen Rearrangements (CCR), mit Beteiligung von 3 Chromosomen.

$t(X;2^*) + \text{Rest } X^* + t(2;10^*)$, ace 10 fehlt

- A #2 in der invertierten DAPI Färbung dargestellt.
- B #2 dargestellt in der Farbkombination FITC, SpO und Cy5.5. Beim rechten Chromosom erkennt man gut einen Teil des Chromosoms X.
- C #10 in der invertierten DAPI Färbung dargestellt.
- D #10 dargestellt in der Farbkombination FITC, SpO und Cy5.5. Beim rechten Chromosom erkennt man gut einen Teil des Chromosoms 2.
- E #X in der invertierten DAPI Färbung dargestellt.
- F #X dargestellt in der Farbkombination FITC, SpO und Cy5.5. Kurz unterhalb des Zentromers ist es zum Bruch gekommen.

Patient 2, mit Amifostin–Behandlung

In 18 MP wurden chromosomale Aberrationen gefunden. Die komplexen Rearrangements sind in kursiv gedruckt, die fettgedruckten Aberrationen sind in **Abb. 3.7–3.8** dargestellt.

Tab. 4 Chromosomale Aberrationen von Patient 2

Reziproke Translokationen	Translokationen	Dizentrische Chromosomen	Einfache Brüche
tr(3;5)	<i>t(2*;16) + dic(9;16)</i>	dic(11;12)	B“ 2
tr(5;8)	<i>t(Y*; 15) + dic(1;15)</i>	dic(6;7)	B“ 5
tr(2;7)		dic(1;9)	B“ 9
tr(7;10)	t(4*;4)	dic(5;7)	
tr(1;13)	t(6*;8)	dic(5;19)	
tr(5;14)	t(17*;18)		
tr(2;15)	t(14*;20)		
	t(4*;8)		
	t(11;11*)		
	t(9*;15)		
	t(9*;17)		
	t(7;14*)		

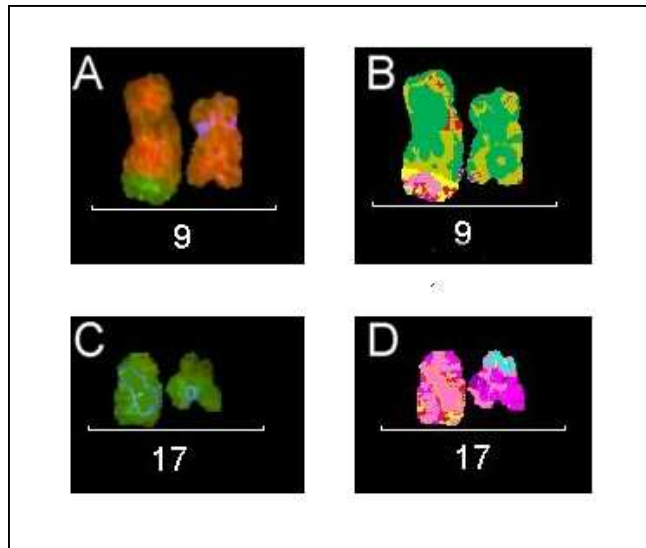


Abb. 3.7 Patient wurde mit Amifostin behandelt.

Darstellung einer Translokation zwischen Chromosom 9 und 17.
 $t(9^*;17) + \text{Rest } 17^* + \text{ace } 9$ fehlt

- A #9 dargestellt in der Farbkombination FITC, SpO und Cy5.5. Am langen Arm des linken Chromosoms 9, erkennt man gut den Teil des Chromosoms 17.
- B Darstellung des #9 mit der Falschfarbendatei HURRA 2.
- C #17 dargestellt in der Farbkombination FITC, SpO und Cy5.5. Beim rechten Chromosom ist zu einem Bruch am langen Arm gekommen.
- D Darstellung des #17 mit der Falschfarbendatei HURRA 2.

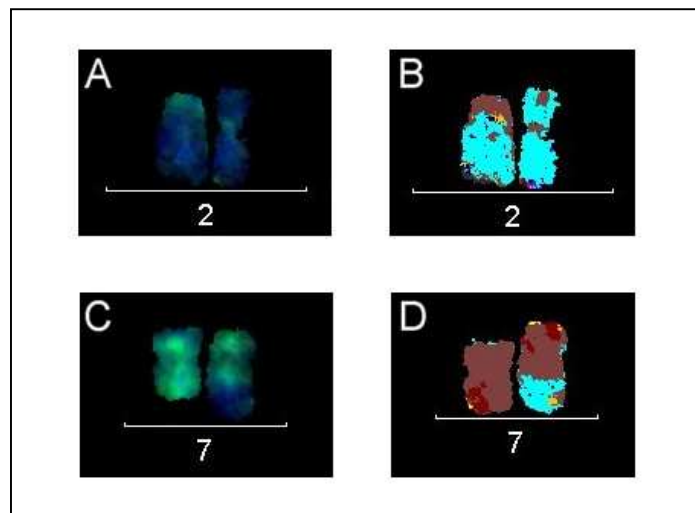


Abb. 3.8 Patient wurde mit Amifostin behandelt.

Darstellung einer reziproken Translokation zwischen Chromosom 2 und Chromosom 7.
 $tr(2;7)$

- A #2 dargestellt in der Farbkombination SpO, Cy5 und Cy5.5. Beim linken Chromosom erkennt man am kurzen Arm einen Teil des Chromosoms 7.
- B Darstellung des #2 mit der Falschfarbendatei HURRA 2.
- C #7 dargestellt in der Farbkombination SpO, Cy5 und Cy5.5. Beim rechten Chromosom erkennt man am langen Arm einen Teil des Chromosoms 2.
- D Darstellung des #7 mit der Falschfarbendatei HURRA 2.

Patient 3, ohne Amifostin–Behandlung

In 13 MP konnten chromosomale Schäden beschrieben werden. In einem Fall lag eine Trisomie des #21 vor (**Abb. 3.10**, MP036). Die komplexen Rearrangements sind in kursiv gedruckt, die fettgedruckten Aberrationen sind in **Abb. 3.9–3.12** dargestellt.

Tab. 5 Chromosomale Aberrationen von Patient 3

Reziproke Translokationen	Translokationen	Dizentrische Chromosomen	Einfache Brüche
tr(1;13)	<i>t(2*;7;17), 2 x B" in #7</i>	dic(5;10)	B" 18
tr(11;19)	<i>t(1;6*) + t(6;10*) +</i>		B" 7
tr(5;12)	<i>t(10;12)</i>		B" 10
	t(X*;2)		B" 7
	t(X*;13)		B" 4
	t(2;5*)		B" 3
	t(9;15*)		B" 1

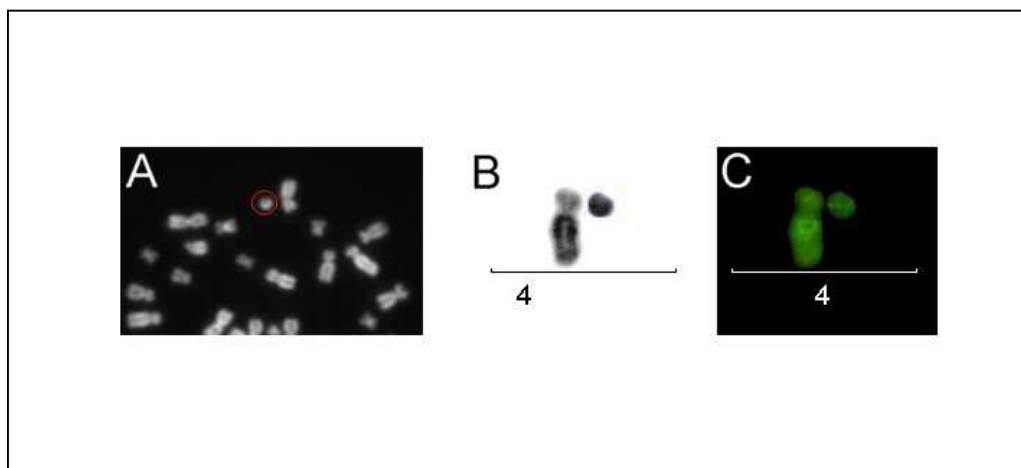


Abb. 3.9 Patient wurde ohne Amifostin behandelt. Darstellung eines Bruches im Chromosom 4, das azentrische (ace) Fragment fehlt. B" 4, ace 4 fehlt

- A Ausschnitt aus der Metaphase P3 126. Mit rotem Kreis umrandet ist der Rest des gebrochenen Chromosoms 4. Darstellung in der DAPI-Färbung.
- B Darstellung der beiden Chromosomen 4 in der invertierten DAPI-Färbung. Beim rechten Chromosom liegt ein Bruch vor.
- C Darstellung der beiden Chromosomen 4 in der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5.

Ergebnisse

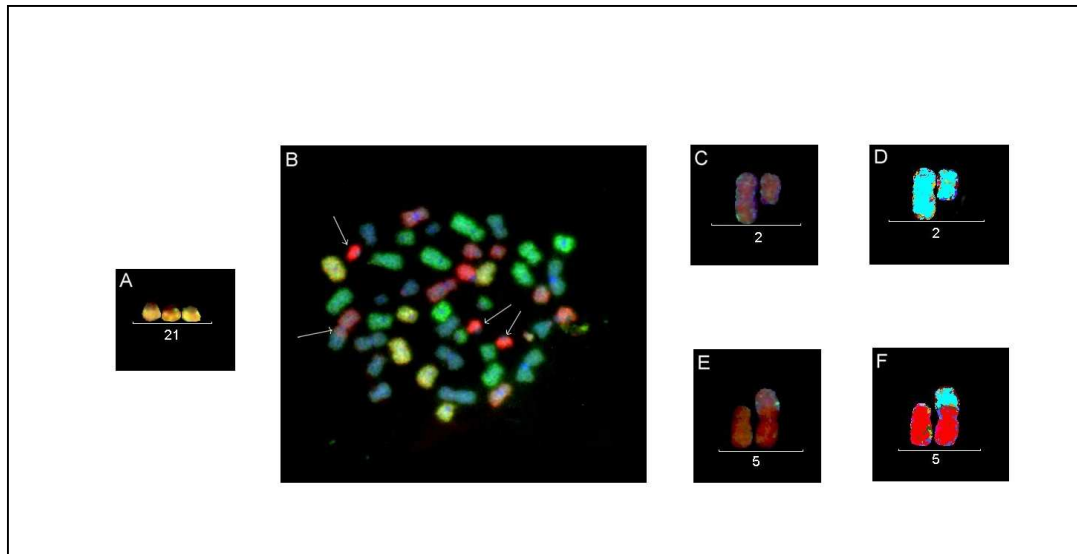


Abb. 3.10 Patient wurde ohne Amifostin behandelt.
Trisomie 21 + $t(2;5^*)$ + Rest 2^* + ace 5 fehlt

- A 3 Chromosomen 21, dargestellt in der Farbkombination TR, Cy5 und Cy5.5.
 B Gesamte Metaphase P3 036 dargestellt mit Hilfe der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5. Die weißen Pfeile zeigen die 3 Chromosomen 21, die alle innerhalb der MP liegen und die Translokation $t(2;5^*)$.
 C #2 dargestellt in der Farbkombination TR, Cy5 und Cy5.5. Das rechte # ist gebrochen.
 D #2 ist mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2 dargestellt.
 E #5 dargestellt in der Farbkombination TR, Cy5 und Cy5.5. Das rechte Chromosom hat sich mit dem Fragment des Chromosom 2 verbunden.
 F #5 ist mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2 dargestellt.

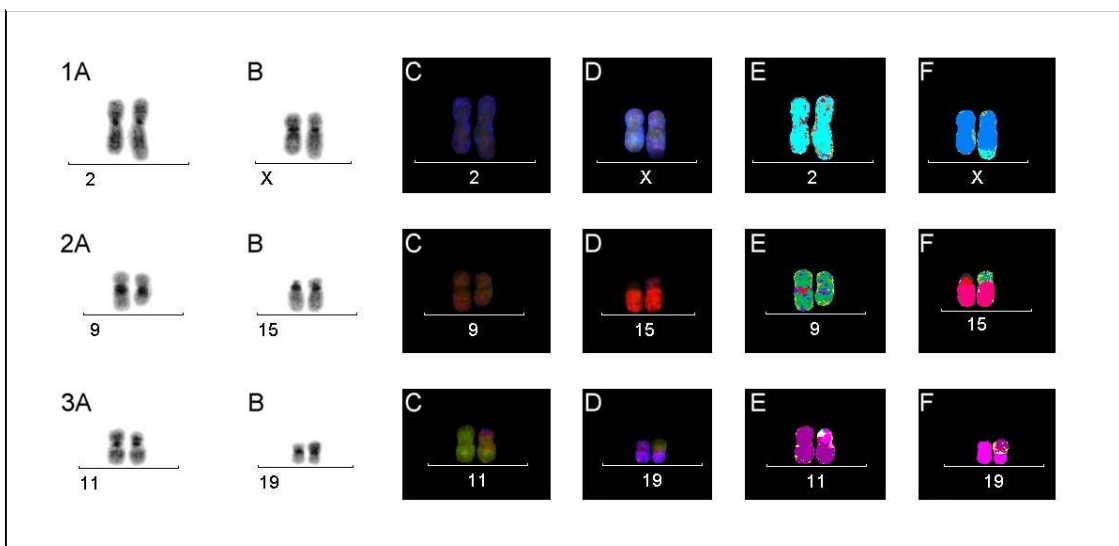


Abb. 3.11 Darstellung unterschiedlicher Translokationen, Pat. ohne Amifostin behandelt.
 1 A-F Einfache Translokation, $t(X^*;2)$ + Rest 2^* + ace X fehlt
 2 A-F Einfache Translokation, $t(9;15^*)$ + Rest 9^* + ace 15 fehlt
 3 A-F Reziproke Translokation, $tr(11;19)$
 1 A,B + 2 A,B + 3 A,B stellen die Chromosomenpaare in der invertierten DAPI-Färbung dar.
 1 C,D + 2 C,D + 3 C,D Darstellung mit der Farbkombination FITC, TR + Cy5.5.
 1 E,F + 2 E,F + 3 E,F stellen die Chromosomenpaare mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2 dar.

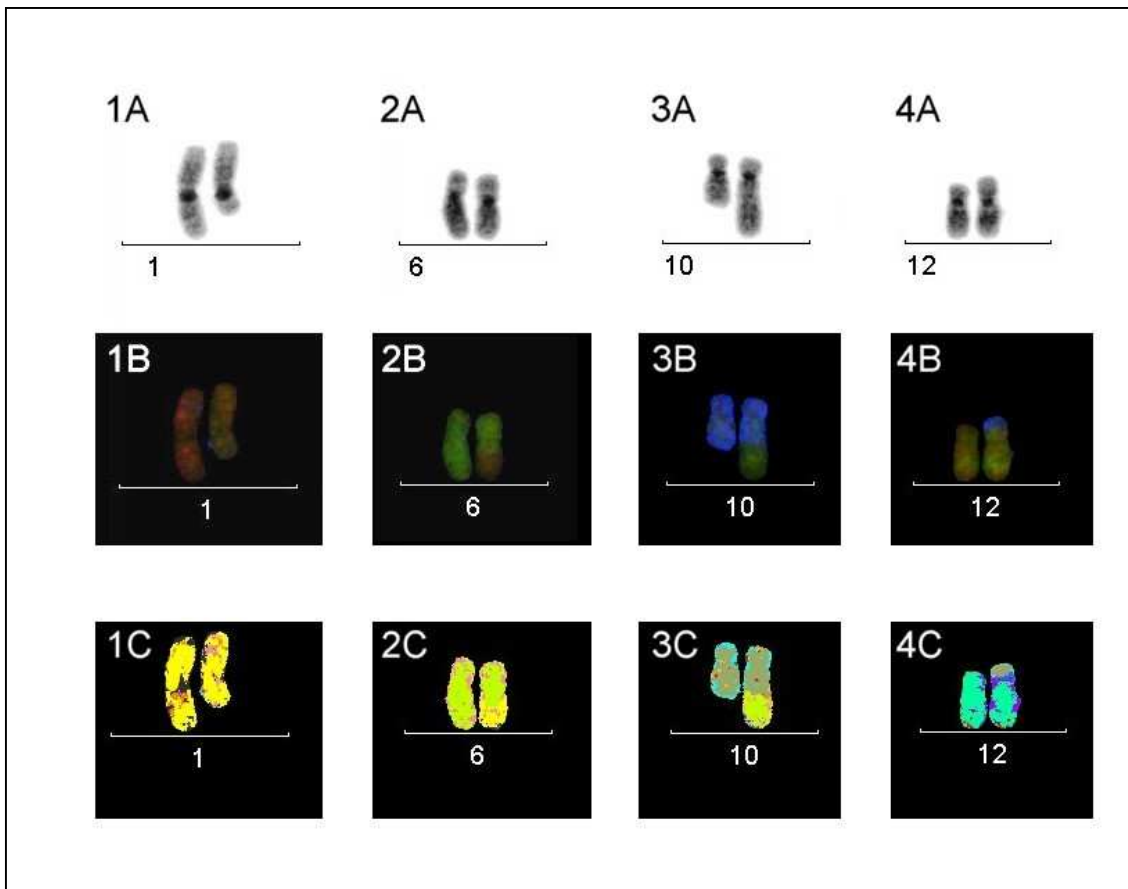


Abb. 3.12

Patient wurde ohne Amifostin behandelt.

Darstellung eines komplexen chromosomalen Rearrangements, an dem 4 Chromosomen beteiligt sind.

$t(1;6^*) + \text{Rest } 1^* + t(6;10^*) + t(10;12^*)$, ace 12 fehlt

1A, 2A, 3A und 4A zeigen die Chromosomenpaare 1, 6, 10 und 12 in der invertierten DAPI-Färbung.

1B, 2B, 3B und 4 B zeigen die Chromosomenpaare 1, 6, 10 und 12 in der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5.

1C, 2C, 3C und 4 C zeigen die Chromosomenpaare 1, 6, 10 und 12 mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2.

1B Das rechte Chromosom 1 zeigt einen Bruch im langen Arm.

2B Am langen Arm des rechten Chromosoms 6 zeigt sich das Fragment des Chromosoms 1.

3B Am langen Arm des rechten Chromosoms 10 zeigt sich das Fragment des gebrochenen Chromosoms 6.

4B Am langen Arm des rechten Chromosoms 12 zeigt sich das Fragment des gebrochenen Chromosoms 10.

Patient 4, mit Amifostin–Behandlung

In 28 MP fand sich kein normaler Chromosomensatz. Es konnten 2 Ringchromosomen (#3, #11) festgestellt werden (**Abb. 3.15, 3.16**). Einmal kam es zu einer Trisomie des #22. Die komplexen Rearrangements sind in kursiv gedruckt, die fettgedruckten Aberrationen sind in **Abb. 3.13–3.16** dargestellt.

Tab. 6 Chromosomale Aberrationen von Patient 4

Reziproke Translokationen	Translokationen	Dizentrische Chromosomen	Einfache Brüche	Andere Aberrationstypen
tr(6;7)	t(1*;9)	dic(2;3)	B“ 13	Ring #11
tr(X;12)	t(4;16*)	dic(2;18)	B“ 15	
tr(2;6)	t(11;13*)	dic(4;20)	B“ 20	Ring #3
tr(8;14)	t(2*;15)		B“ 5	
tr(2;3)	t(3*;21)	<i>dic(Y;4) (2 x</i>	B“ 6	
tr(15;19)	t(6*;6)	<i>Bruch im #4)</i>	B“ 4	
tr(6;10)	t(1;21*)		B“ 4	
tr(4;9)	t(16*;20)		B“ 2	
tr(1;20)	t(15*;16)		B“ 1	
tr(4;10)	t(1*;14)			
tr(2;8)	t(14;12*)			
tr(4;X)	t(12*;20)			
	t(5;15*)			
	t(18*;20)			
	<i>t(8*;13) +</i>			
	<i>t(8;13*)</i>			

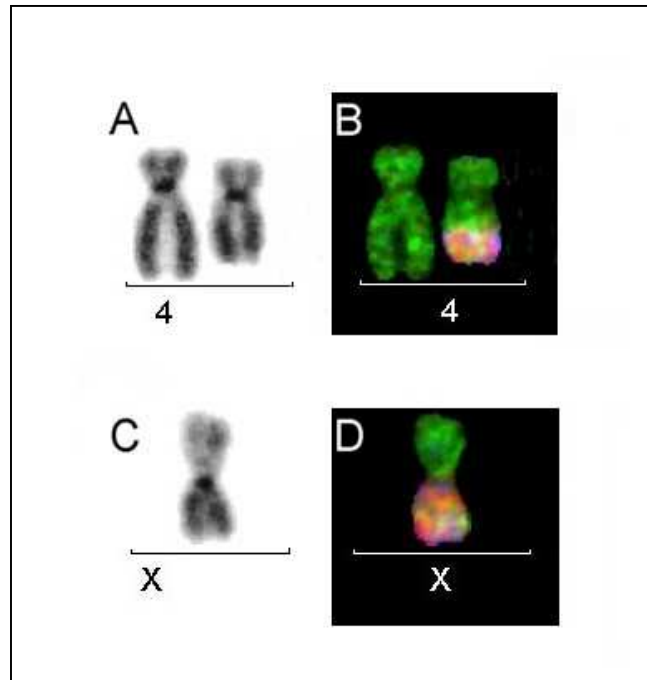


Abb. 3.13 Patient wurde mit Amifostin behandelt.

Darstellung einer reziproken Translokation zwischen Chromosom 4 und Chromosom X.
tr(4;X)

- A Chromosomenpaar 4 ist dargestellt in der invertierten DAPI-Färbung.
- B Chromosomenpaar 4 ist mit Hilfe der Farbkombination FITC, SpO und Cy5.5 dargestellt. Das rechte Chromosom wirkt deutlich verkürzt und am langen Arm erkennt man ein Fragment des Chromosoms X.
- C Chromosom X dargestellt in der invertierten DAPI-Färbung.
- D Chromosom X dargestellt in der Farbkombination FITC, SpO und Cy5.5. Der kurze Arm des Chromosoms trägt ein Fragment des Chromosoms 4.

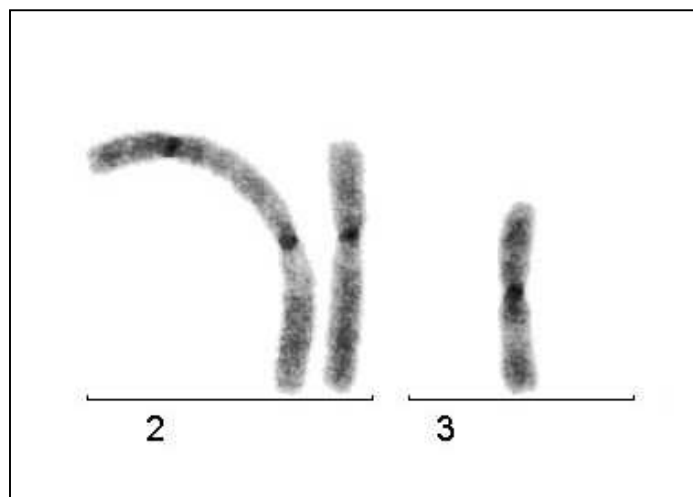


Abb. 3.14
Patient wurde mit Amifostin behandelt.

Darstellung eines dizentrischen Chromosoms, zusammengesetzt aus Anteilen des Chromosoms 2, sowie des Chromosoms 3. dic(2;3)

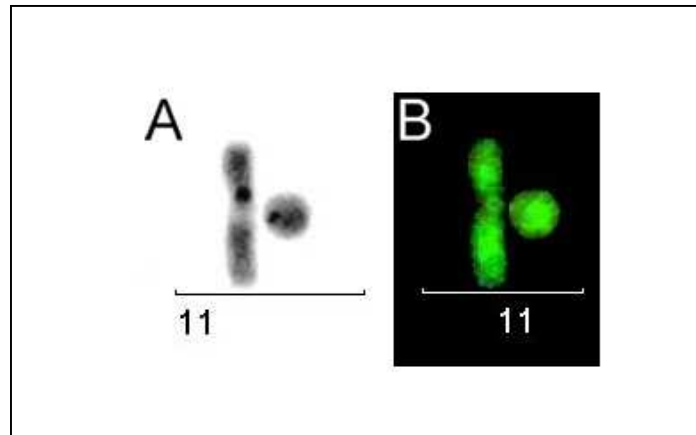


Abb. 3.15 Patient wurde mit Amifostin behandelt.
Ring im Chromosom 11.

- A Darstellung des Chromosoms 11 in der invertierten DAPI-Färbung. Das rechte Chromosom ist 2 mal gebrochen und hat sich mit seinen beiden Enden wieder verbunden.
- B Darstellung des Chromosoms 11 in der Farbkombination, FITC, SpO und Cy5.5.

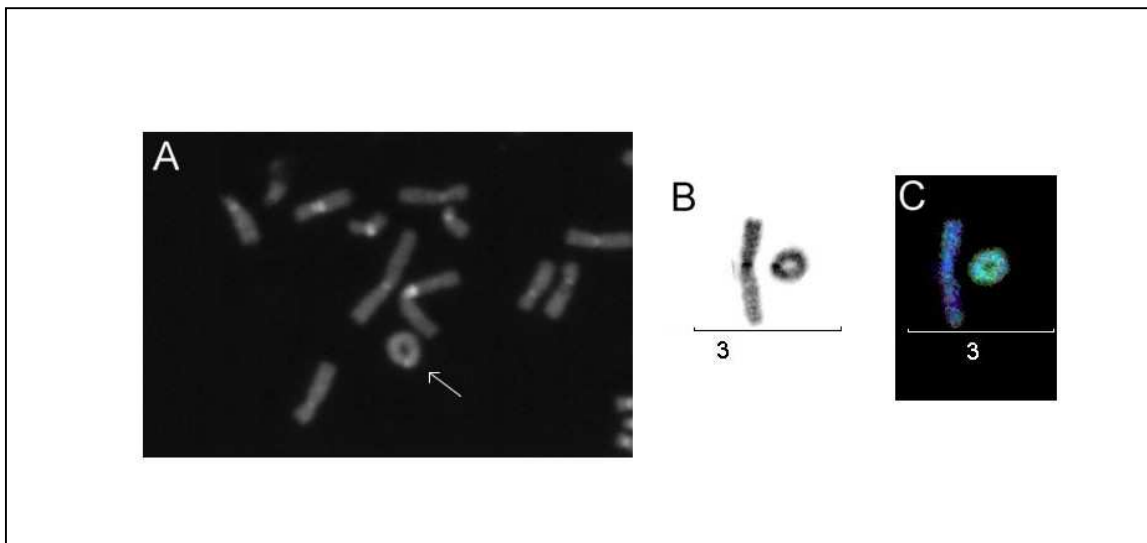


Abb. 3.16 Patient wurde mit Amifostin behandelt.
Ring im Chromosom 3.

- A Ausschnitt aus der Metaphase P4 116, Darstellung mit Hilfe der DAPI-Färbung. Der weiße Pfeil markiert das Ringchromosom 3.
- B Darstellung des Chromosomenpaares 3 in der invertierten DAPI-Färbung. Das rechte Chromosom ist mindestens 2 mal gebrochen und hat sich mit seinen beiden Enden wieder verbunden.
- B Darstellung des Chromosoms 3 in der Farbkombination, DAPI, FITC und SpO.

Patient 5, mit Amifostin–Behandlung

Von 100 MP wiesen 28 deutliche chromosomale Aberrationen auf. Non-disjunctions, Teilungsartefakte und Markerchromosomen traten auf (**Abb. 3.19**). Die komplexen Rearrangements sind in kursiv gedruckt, die fettgedruckten Aberrationen sind in **Abb. 3.17–3.20** dargestellt.

Tab. 7 Chromosomale Aberrationen von Patient 5

Reziproke Translokationen	Translokationen	Einfache Brüche	Andere Aberrationstypen
tr(4;11)	<i>t(11;18*;14) +</i>	B“ 10	Inversion
tr(2;7)	<i>t(11*;18) + t(14*;18)</i>	B“ 4	inv #11
tr(1;4)	t(2*;12) + t(2;3*) +	B“ 5	inv #1
tr(5;16)	t(3;12*)	B“ 17	
tr(10;11)	t(5*;6) + t(6*;16)	B“ 18	Insertion
tr(5;22)	t(6;7*) + t(6;11*)	B“ 9	<i>Ins (5*;17)</i>
tr(X;6)	<i>t(11;15*) + dic(4;15)</i>	B“ 8	
tr(7;9)		B“ 13	Non-disjunction
tr(4;16)	t(2,13*)	B“ 5	2 x
tr(8;17)	t(3*;10)		der(5) t(17;5*;17)
tr(5;8)	t(X;8*)		
tr(5;7)	t(X;6*)		
tr(6;21)	t(7*;12)		
tr(2;7)	t(1*;16)		
tr(4;16)	t(8*;16)		
tr(15;22)	t(9*;Y)		
tr(2;4)	t(9*;14)		
tr(5;12)	t(2;14*)		
	t(9;17*)		
	t(11;16*)		

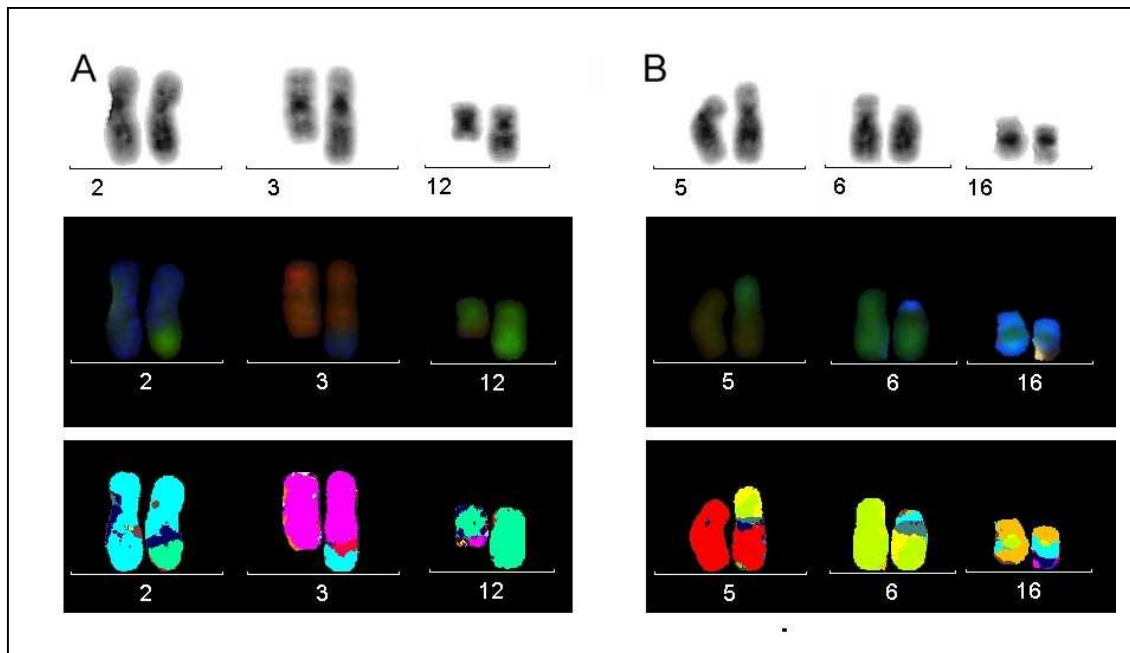


Abb. 3.17 Der Patient wurde mit Amifostin behandelt.

In der ersten Reihe sind die Chromosomenpaare 2, 3, 12 und 5, 6, 16 in der invertierten DAPI-Färbung dargestellt. In der zweiten Reihe sind die gleichen Paare mit Hilfe der Farbkombination FITC, TR, und Cy5.5 dargestellt, eine Reihe darunter mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2.

A $t(2^*;12) + t(2;3^*) + t(3;12^*)$

Das rechte # 2 ist am langen Arm gebrochen und hat sich mit einem Fragment des langen Armes des #12 verbunden, während sich das Fragment des 2er Chromosoms mit dem langen Arm des ebenfalls gebrochenen #3 verbunden hat. Das Fragment des 3er Chromosoms hat sich mit dem Rest des 12er Chromosoms verbunden. Ein komplexes chromosomales Rearrangement.

B $t(5^*;6) + t(6^*;16) + \text{Rest } 16^* + \text{ace } 5 \text{ fehlt}$

Das rechte #5 ist am kurzen Arm gebrochen und hat sich mit einem Fragment des kurzen Armes des #6 verbunden, während das Fragment des 5er Chromosoms fehlt. Das gebrochene 6er Chromosom hat sich mit dem Fragment des ebenfalls gebrochenen #12 verbunden.

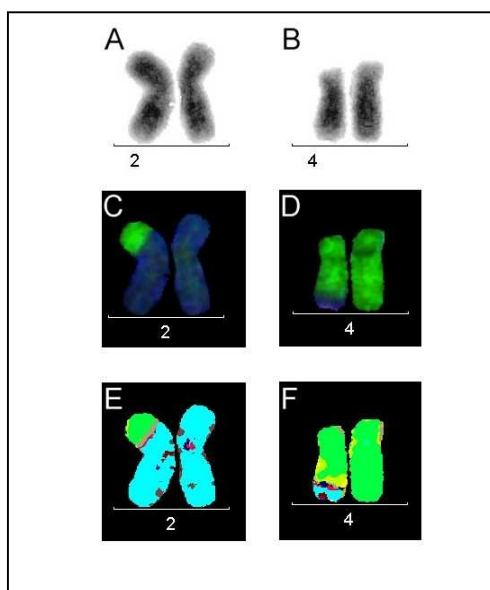


Abb. 3.18 Patient mit Amifostin behandelt.

Darstellung einer reziproken Translokation, $tr(2;4)$.

A #2 dargestellt in der invertierten DAPI-Färbung.

B #4 dargestellt in der invertierten DAPI-Färbung.

C Chromosomenpaar 2 abgebildet mit Hilfe der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5. Beim linken Chromosom erkennt man die Farbänderung am kurzen Arm. Dort ist das # 2 gebrochen und hat sich mit einem Fragment des ebenfalls gebrochenen # 4 verbunden.

D Chromosomenpaar 4 abgebildet mit Hilfe der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5. Beim linken Chromosom erkennt man die Farbänderung am langen Arm. Dort ist das # 4 gebrochen und hat sich mit einem Fragment des ebenfalls gebrochenen # 2 verbunden.

E Abbildung des Chromosomenpaar 2 mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2.

F Abbildung des Chromosomenpaar 2 mit Hilfe der Falschfarbeidatei HURRA 2.

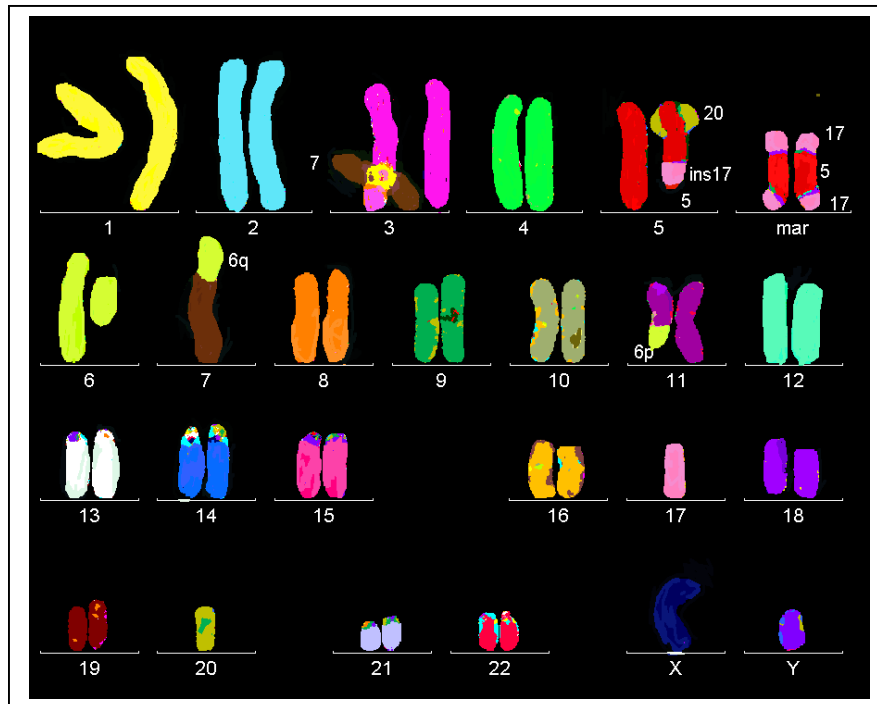


Abb. 3.19 Patient wurde mit Amifostin behandelt.

Das Karyogramm der Metaphase ist im Falschfarbenmodus HURRA 2 dargestellt. Es findet sich ein komplexes chromosomales Rearrangement, $t(6;7^*) + t(6;11^*) + \text{Rest } 6$, ace 7,11 fehlen. Gleichzeitig findet sich eine Insertion eines Fragmentes des #17 in ein # 5, $\text{Ins}(5^*;17)$ und eine Non-disjunction mit einem doppelt angelegten derivativen Chromosom 5: $2x \text{ der}(5)t(17;5;17)$.

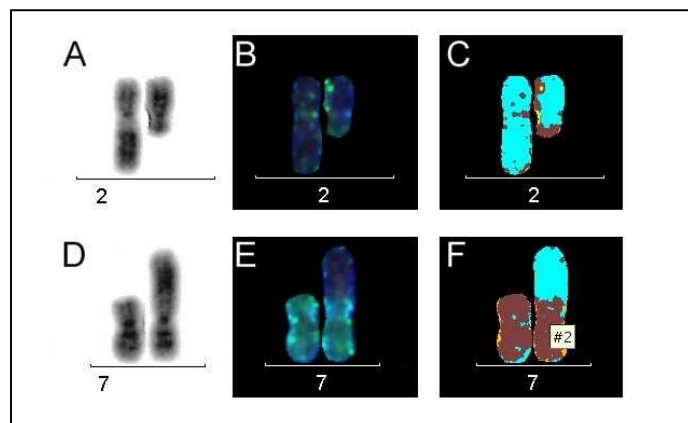


Abb. 3.20

Darstellung einer reziproken Translokation, $\text{tr}(2;7)$, der Patient wurde mit Amifostin behandelt.

- A Chromosomenpaar 2 dargestellt in der invertierten DAPI-Färbung.
- B Darstellung des Chromosomenpaares 2 mit Hilfe der Farbkombination TR, Cy5 und Cy5.5. Der lange Arm des rechten Chromosoms fehlt und ein Fragment des ebenfalls gebrochenen # 7 hat sich mit der Bruchstelle verbunden.
- C Abbildung des Chromosomenpaares 2 mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2.
- D Chromosomenpaar 7 dargestellt in der invertierten DAPI-Färbung.
- E Darstellung des Chromosomenpaares 7 mit Hilfe der Farbkombination TR, Cy5 und Cy5.5. Der kurze Arm des rechten Chromosoms ist gebrochen und ein Fragment des ebenfalls gebrochenen # 2 hat sich mit der Bruchstelle verbunden.
- F Abbildung des Chromosomenpaares 7 mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2.

Patient 6, ohne Amifostin–Behandlung

In 23 MP traten sichtbare Veränderungen der Chromosomen auf. Die komplexen Rearrangements sind in kursiv gedruckt, die fettgedruckten Aberrationen sind in **Abb. 3.21–3.24** dargestellt.

Tab. 8 Chromosomale Aberrationen von Patient 6

Reziproke Translokationen	Translokationen	Dizentrische Chromosomen	Einfache Brüche	Andere Aberrationstypen
tr(5;6)	<i>t(7;12*) + dic(7;21)</i>	dic(11;20)	B“ 1	Inversionen inv #1
tr(9;10)	<i>t(2;11*) + t(2*;11)</i>	dic(12;18)	B“ 1	
tr(1;15)	+ <i>t(12;17*;1) +</i>	dic(2;16)	B“ 2	
tr(Y;9)	<i>t(1*;12)</i>		B“ 17	
tr(6;20)	<i>t(5*;12) + t(5;12*),</i>			
tr(16;18)	<i>(2 x B“ in #12)</i>			
tr(1;22)	t(20;22*)			
tr(1;11)	t(14*;17)			
tr(9;10)	t(4*;11)			
tr(X;5)	t(4*;19)			
tr(9;17)	t(1*;17)			
tr(5;6)	t(6*;6)			
tr(15;16)	t(8;9*)			
	t(11;20*)			
	t(14*;12)			
	t(14;17*)			

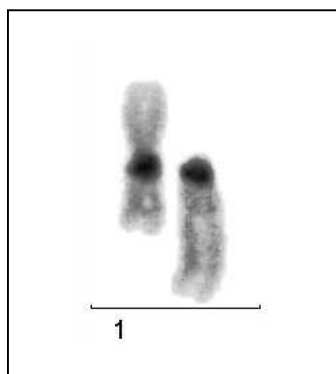


Abb. 3.21
Invertiertes Chromosom 1.
Patient wurde ohne Amifostin behandelt.

Ergebnisse

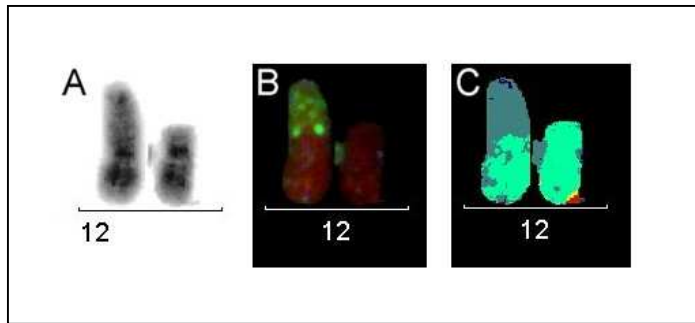


Abb. 3.22 ohne Amifostin
Dizentrisches Chromosom,
dic(12;18), ace 12,18 fehlen.

- A Chromosomenpaar 12 dargestellt in der invertierten DAPI-Färbung. Das linke Chromosom 12 hat sich mit dem #18 verbunden und ist dizentrisch.
- B Darstellung der beiden Chromosomen mit der Farbkombination TR, Cy5 und Cy5.5.
- C Darstellung der beiden Chromosomen mit der Falschfarbeindatei HURRA 2.

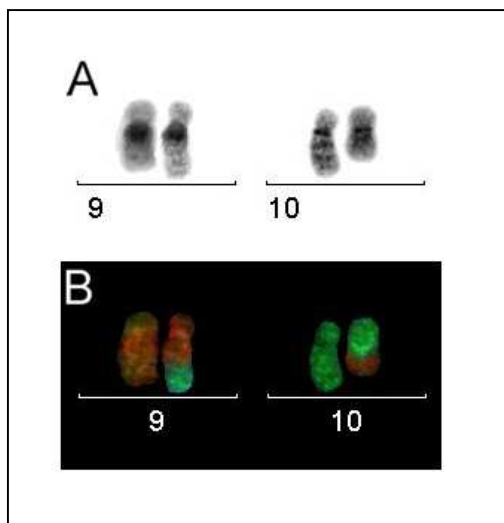


Abb. 3.23 Pat. ohne Amifostin behandelt.
Reziproke Translokation, tr(9;10)

- A Chromosomenpaar 9 und 10 sind in der invertierten DAPI-Färbung dargestellt.
- B Chromosomenpaar 9 und 10 dargestellt mit der Farbkombination FITC, SpO und Cy5.5. Der lange Arm des rechten Chromosoms 9 ist gebrochen und das Fragment hat sich an den langen Arm des Chromosoms 10 angelagert. Das gebrochene Fragment des Chromosoms 10 hat sich mit der Bruchstelle des Chromosoms 9 verbunden.

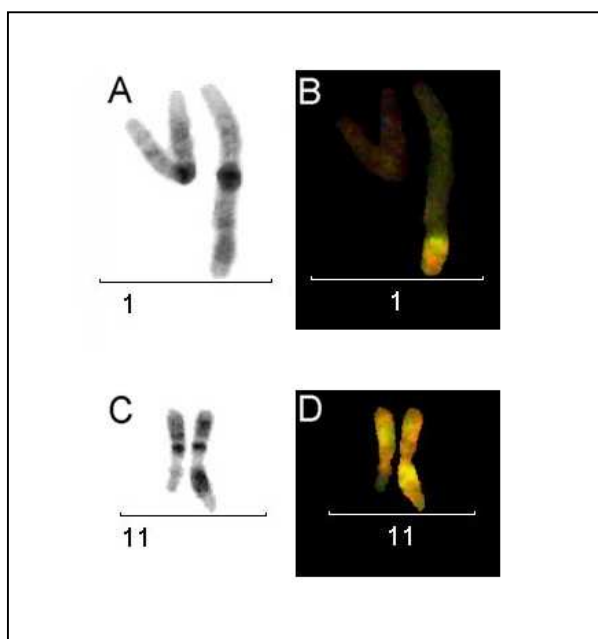


Abb. 3.24 Pat. ohne Amifostin behandelt.
Reziproke Translokation, tr(1;11)

- A Chromosomenpaar 1 ist im invertierten DAPI-Bild dargestellt.
- B Chromosomenpaar 1 dargestellt in der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5. Am langen Arm des rechten Chromosoms ist es zu einem Bruch und zu einer Verbindung mit dem Fragment des ebenfalls gebrochenen 11er Chromosoms gekommen.
- C Chromosomenpaar 11 ist im invertierten DAPI-Bild dargestellt.
- D Chromosomenpaar 11 dargestellt in der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5. Bruch des langen Arms des linken Chromosoms und Verbindung mit dem Fragment des gebrochenen 1er Chromosoms.

Patient 7, mit Amifostin–Behandlung

13 MP zeigten chromosomale Aberrationen. Die fettgedruckten Aberrationen sind in **Abb. 3.25–3.27** dargestellt.

Tab. 9 Chromosomale Aberrationen von Patient 7

Reziproke Translokationen	Translokationen	Dizentrische Chromosomen	Einfache Brüche	Andere Aberrationstypen
tr(9;15)	t(11;15*)	dic(5;12)	B“ 4	Inversionen
tr(11;12)	t(12;20*)	dic(9;15)	B“ 13	inv #2
tr(10;16)	t(5;13*)		B“ 1	
tr(12;17)	t(5;8*)		B“ 15	
tr(15;16)	t(2;5*)		B“ 7, (2	
tr(10;15)	t(8*;12)		Brüche)	
	t(3;12*)			

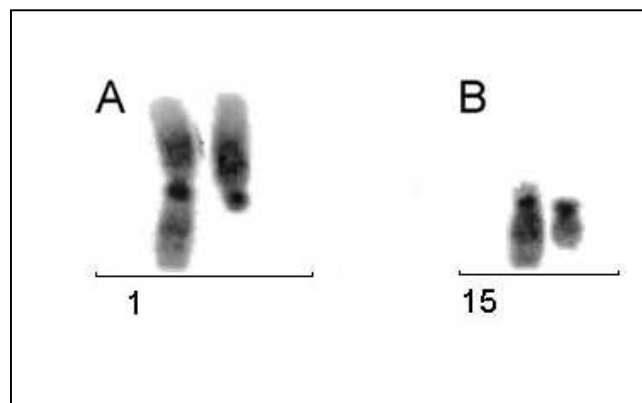


Abb. 3.25 Patient wurde mit Amifostin behandelt.

- Die Chromosomenpaare 1 und 15 sind in der invertierten DAPI-Färbung dargestellt.
- A Bruch im Chromosom 1 kurz nach dem Zentromerbereich. Kompletter Verlust des langen Armes.
 - B Bruch im Chromosom 15. Ein Teil des langen Armes fehlt.

Ergebnisse

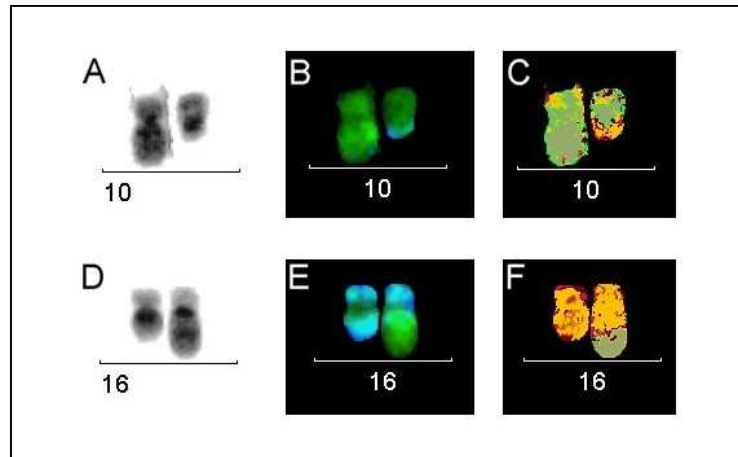


Abb. 3.26 Patient wurde mit Amifostin behandelt.

Darstellung einer reziproken Translokation, $tr(10;16)$.

Darstellung der Chromosomenpaare 10 und 16 in der invertierten DAPI-Färbung (A;D), mit der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5 (B;E) und mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2 (C;F).

- B Das rechte Chromosom ist am langen Arm gebrochen und hat sich mit einem Fragment des Chromosoms 16 verbunden.
- E Das rechte Chromosom ist am langen Arm gebrochen und hat sich mit dem Fragment des ebenfalls gebrochenen Chromosoms 10 verbunden.

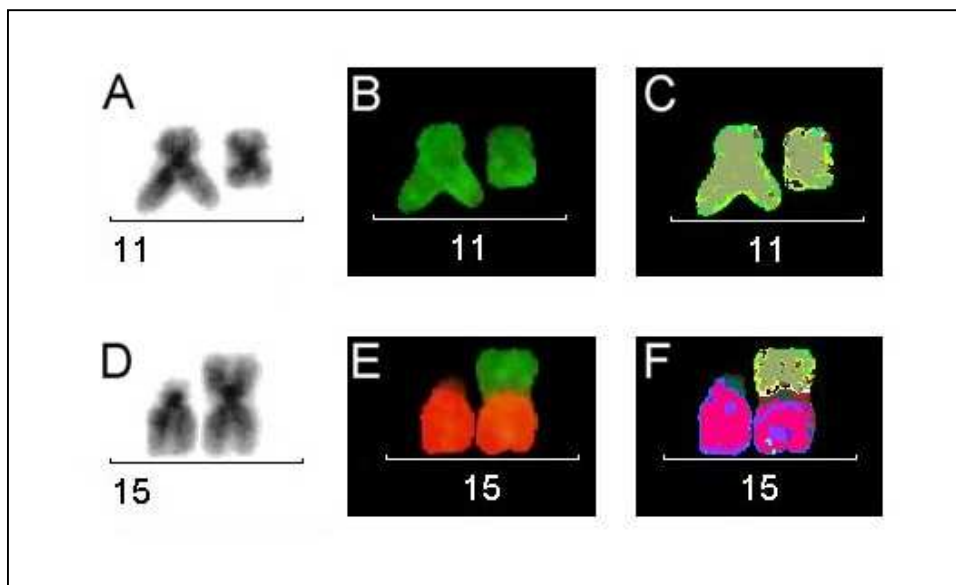


Abb. 3.27 Patient wurde mit Amifostin behandelt.

Darstellung einer Translokation zwischen Chromosom 11 und 15.

$t(11;15^*) + \text{Rest } 11^* + \text{ace } 15 \text{ fehlt}$

Darstellung der Chromosomenpaare 11 und 15 in der invertierten DAPI-Färbung (A;D), mit der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5 (B;E) und mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA2 (C;F).

- B Das rechte Chromosom weist einen Bruch im langen Arm auf.
- E Das rechte Chromosom 15 hat einen Bruch oberhalb der Zentromerregion und hat sich anschließend mit dem azentrischen Fragment des ebenfalls gebrochenen Chromosoms 11 verbunden.

Patient 8, mit Amifostin–Behandlung

In 14 MP waren deutliche chromosomale Schäden erkennbar. Interessant war in einer MP ein Chromosom 5 (**Abb. 3.28**) mit einer interstitiellen Deletion. In 2 MP stellten sich Markerchromosomen dar, die sehr wahrscheinlich vom #4 stammen (**Abb. 3.30**). Die komplexen Rearrangements sind in kursiv gedruckt, die fettgedruckten Aberrationen sind in **Abb. 3.28–3.31** dargestellt.

Tab. 10 Chromosomale Aberrationen von Patient 8

Reziproke Translokationen	Translokationen	Einfache Brüche	Andere Aberrationstypen
tr(16;20)	<i>t(2;11*) + t(2*;13) +</i>	B“ 8	Inters. Del #5
tr(1;13)	<i>t(X*;11) + t(X;14*)</i>	B“ 4	
tr(4;13)		B“ 9	
tr(12;18)	t(4*;10)	B“ 2	
tr(9;14)	t(4;11*)	B“ 17	
tr(7;16)			
tr(3;6)			
tr(4;16)			

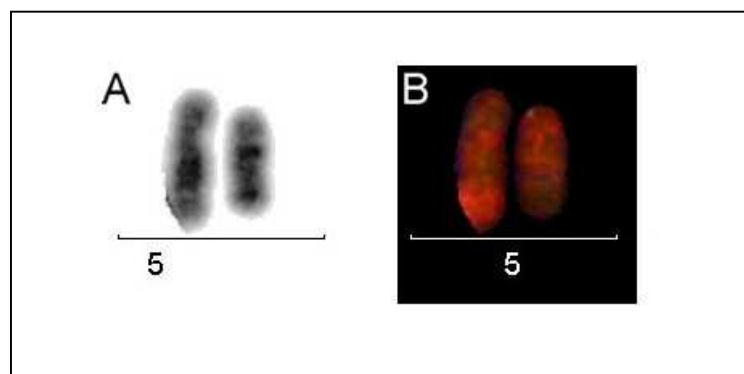


Abb. 3.28 Patient wurde mit Amifostin behandelt.

- Darstellung eines Chromosoms mit einer interstitiellen Deletion, Inters. Del #5
- A Invertierte DAPI-Färbung des Chromosomenpaares 5. Das Bandenmuster des rechten Chromosoms stimmt nicht mit dem des linken Chromosoms überein.
 - B Chromosomenpaar 5 dargestellt in der Farbkombination FITC, SpO und Cy5.5. Hier sind keine Auffälligkeiten zu erkennen. Das rechte Chromosom 5 ist verkürzt.

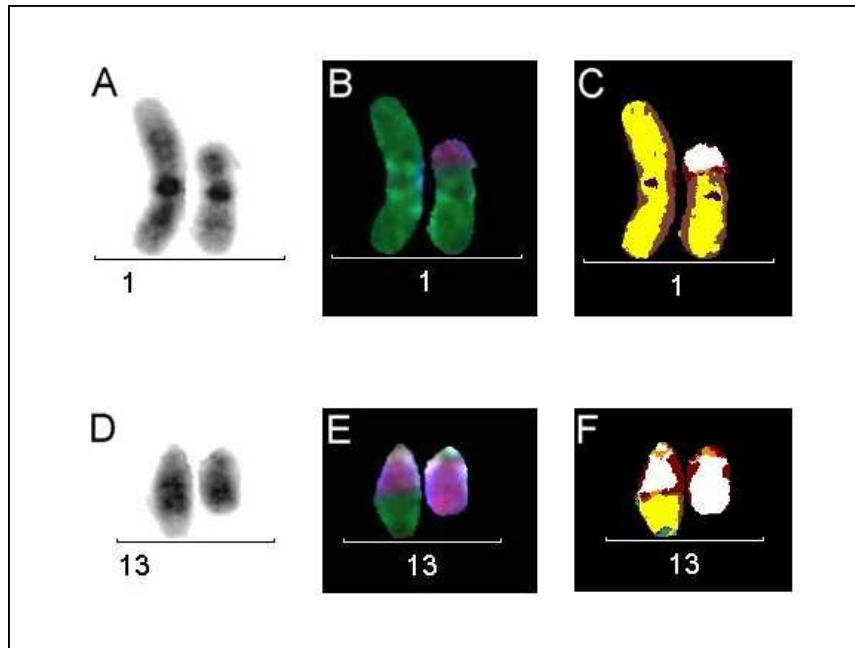


Abb. 3.29 Patient wurde mit Amifostin behandelt.

In diesem Bild ist eine reziproke Translokation zwischen Chromosom 1 und 13 zu sehen. tr(1;13)

Darstellung der Chromosomenpaare 1 und 13 in der invertierten DAPI-Färbung (A;D), mit der Farbkombination TR, Cy5 und Cy5.5 (B;E) und mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2 (C;F).

- A Verkürzung des rechten Chromosoms erkennbar.
- B Verbindung des Chromosoms 1 mit einem Fragment des Chromosoms 13.
- D Das linke Chromosom wirkt verlängert.
- E Mit der Bruchstelle des Chromosoms 13 hat sich das azentrische Fragment des ebenfalls gebrochenen Chromosoms 1 verbunden.

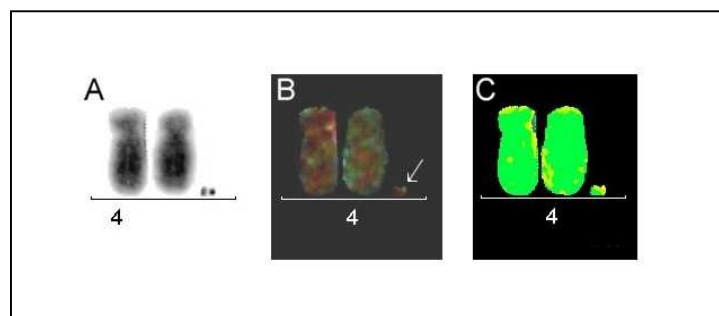


Abb. 3.30 Patient wurde mit Amifostin behandelt.

Darstellung eines Markerchromosoms. Sehr wahrscheinlich stammt es vom Chromosom 4.

- A Das Chromosomenpaar 4 in der invertierten DAPI-Färbung dargestellt. Rechts neben den beiden Chromosomen erkennt man einen kleinen Marker.
- B Darstellung des Chromosomenpaares 4 in der Farbkombination TR, Cy5 und Cy5.5. Der weiße Pfeil kennzeichnet den Marker, der in allen verschiedenen Farbkombinationen die Färbung des Chromosoms 4 annimmt.
- C Abbildung des Chromosomenpaares 4 mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2. Auch im Falschfarbmodus nimmt der Marker die Färbung des Chromosoms 4 an.

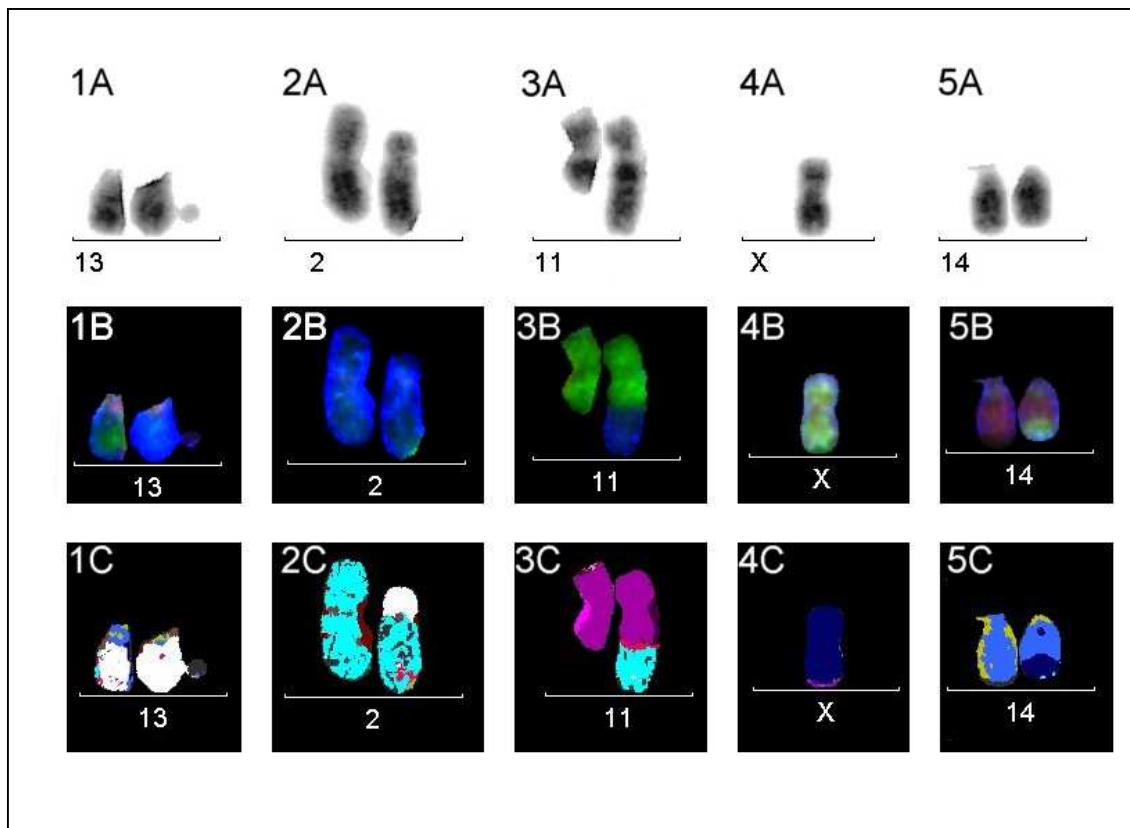


Abb. 3.31

Darstellung eines komplexen chromosomalen Rearrangements, an dem 5 Chromosomen beteiligt sind. Der Patient wurde mit Amifostin behandelt.

$t(2;11^*) + t(2^*;13) + \text{Rest } 13^* + t(X^*;11) + t(X;14^*)$, ace 14 fehlt

In der oberen Reihe sind die Chromosomenpaare 2, 11, 13, 14 und das X Chromosom in der invertierten DAPI-Färbung dargestellt (1A-5A). Eine Reihe darunter sind die gleichen Chromosomen in der Farbkombination FITC, SpO und Cy5.5 abgebildet (1B-5B). In der untersten Reihe werden die Chromosomen mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2 dargestellt (1C-5C).

Das Fragment des gebrochenen Chromosoms 13 (1A-1C) hat sich mit dem ebenfalls gebrochenen Chromosom 2 verbunden (kurzer Arm des rechten 2er Chromosoms 2A-C). Das Fragment des 2er Chromosoms wiederum hat sich mit dem gebrochenen Chromosom 11 verbunden (langer Arm des rechten 11er Chromosoms 3A-3C). Das Fragment des Chromosoms 11 hat sich mit dem gebrochenen langen Arm des X Chromosoms verbunden (4A-4C). Auch Chromosom 14 ist gebrochen (langer Arm des rechten Chromosoms 5A-5C) und die Bruchstelle hat sich mit dem Fragment des X Chromosoms verbunden. Das azentrische Fragment des Chromosoms 14 fehlt. Insgesamt handelt es sich hier um ein komplexes chromosomales Rearrangement, an dem 5 Chromosomen beteiligt sind.

Patient 9, ohne Amifostin–Behandlung

Von 100 MP zeigten bei diesem Patienten 35 MP strukturelle Veränderungen der Chromosomen. 2 mal trat eine Non–disjunction der geschlechtsdeterminierenden Chromosomen auf (**Abb. 3.35**). Die komplexen Rearrangements sind in kursiv gedruckt, die fettgedruckten Aberrationen sind in **Abb. 3.32–3.34** dargestellt.

Tab. 11 Chromosomale Aberrationen von Patient 9

Reziproke Translokationen	Translokationen	Dizentrische Chromosomen	Einfache Brüche	Andere Aberrationstypen
tr(4;18)	<i>t(5*;13) +</i>	dic(6;7)	B“ 7	Inversionen
tr(2;4)	<i>t(13*;15) +</i>	dic(5;12)	B“ 10	inv #1
tr(X;3)	<i>t(15*;5)</i>	dic(9;19)	B“ 2	inv #1
tr(3;6)		dic(8;20)	B“ 4	
tr(8;12)	<i>t(1*;15) +</i>	dic(16;17)		
tr(10;11)	<i>t(X;15*)+</i>	dic(14;18)		
tr(1;16)	<i>t(X*;1)</i>	dic(9;14)		
tr(3;18)				
tr(13;18)	<i>t(9;22*)</i>			
tr(6;8)	t(9*;9)			
tr(8;11)	<i>t(4*;X)</i>			
tr(10;19)	<i>t(3*;7)</i>			
tr(8;14)	t(9*;9)			
tr(14;19)	<i>t(1*;10)</i>			
tr(1;17)	<i>t(4*;9)</i>			
tr(14;18)	<i>t(11*;16)</i>			
tr(3;6)	<i>t(6*;6)</i>			
tr(1;16)				
tr(2;6)				
tr(3;8)				
tr(16;20)				

Ergebnisse

tr(7;16)				
tr(5;9)				
tr(3;18)				
tr(13;15)				
tr(6;11)				
tr(3;21)				

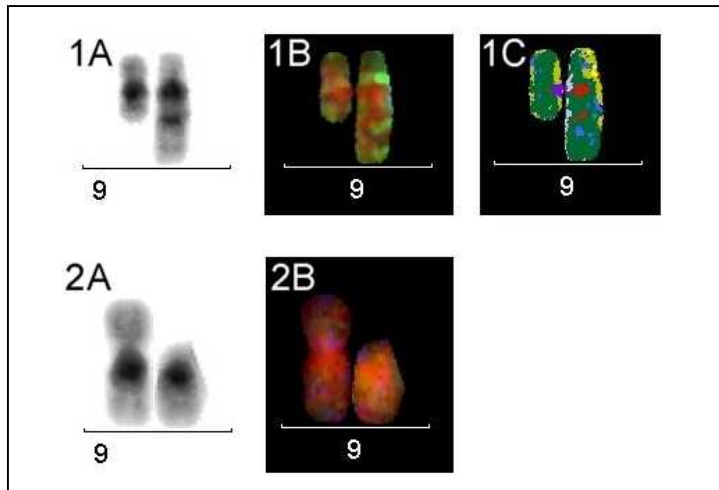


Abb. 3.32 Patient wurde ohne Amifostin behandelt. Darstellung von zwei Translokationen, $t(9;9^*)$ + Rest 9. In zwei verschiedenen Metaphasen (MP035 und MP041) kam es zu diesem Phänomen. Beide Chromosomen 9 sind gebrochen und das Fragment des einen Chromosoms hat sich mit dem anderen Chromosom 9 wieder verbunden.

MP035

- 1A invertierte DAPI-Färbung
- 1B Farbkombination SpO, Cy5 und Cy5.5
- 1C Falschfarbendatei HURRA 2

MP041

- 2A invertierte DAPI-Färbung
- 2B Farbkombination FITC, SpO + Cy5

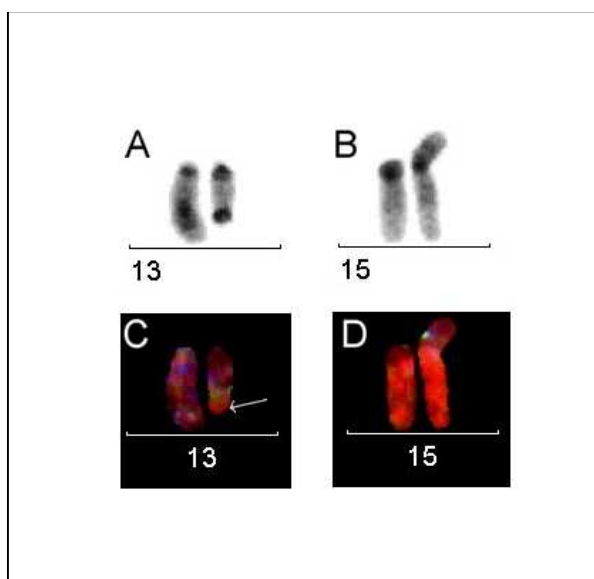


Abb. 3.33 Pat. ohne Amifostin behandelt.

Darstellung einer reziproken Translokation, $tr(13;15)$.

- A+B invertierte DAPI-Färbung.
- C+D Farbkombination TR, Cy5 und Cy5.5.

Es hat eine reziproke Translokation zwischen Chromosom 13 und Chromosom 15 stattgefunden. Der weiße Pfeil (C) zeigt das Fragment des Chromosoms 15, das sich mit dem Chromosom 13 verbunden hat. Das Fragment des Chromosoms 13 hat sich mit dem kurzen Arm des rechten Chromosoms 15 verbunden (D).

Ergebnisse

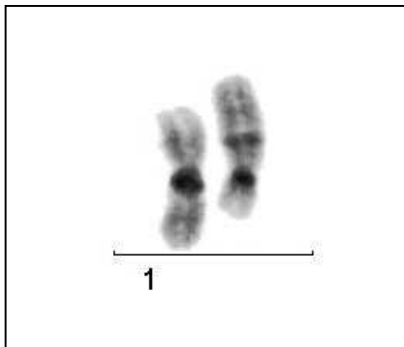


Abb. 3.34 Patient ohne Amifostin-Behandlung.
Invertiertes Chromosom 1, inv # 1.
Darstellung des Chromosoms 1 in der invertierten DAPI-Färbung. Das rechte Chromosom 1 ist sowohl am langen als auch am kurzen Arm gebrochen. Das Fragment des langen Armes hat sich mit der Bruchstelle des kurzen Armes verbunden.

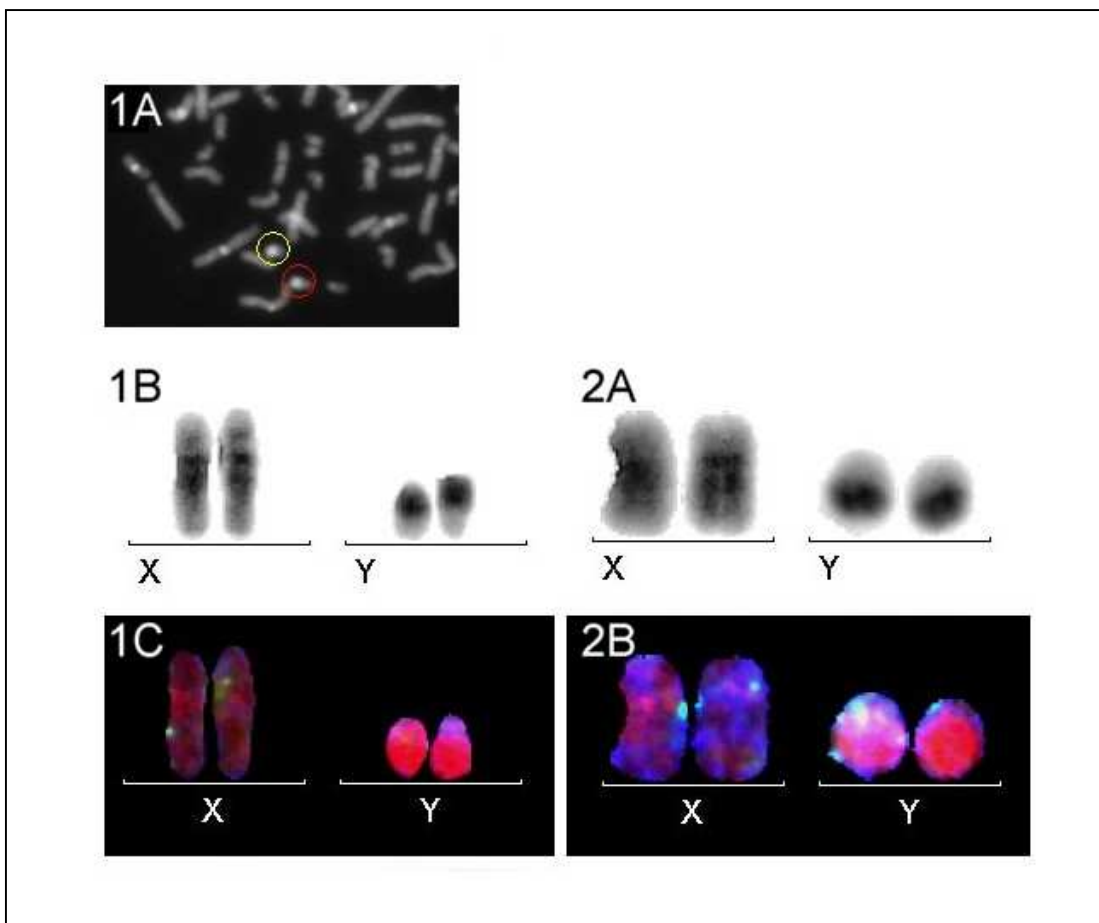


Abb. 3.35 Patient wurde ohne Amifostin behandelt.
48, XXYY Non-disjunction X und Y, normalerweise ist der Karyotyp dieses Patienten 46, XY.

- 1A Ausschnitt aus einem Teil der Metaphase P9 092 in der DAPI-Färbung. Gelb und rot sind die beiden Y Chromosomen eingekreist.
- 1B Die beiden Chromosomenpaare X und Y in der invertierten DAPI-Färbung dargestellt.
- 1C Darstellung der beiden X und Y Chromosomen in der Farbkombination pO, Cy5 und Cy5.5.
- 2A Die beiden Chromosomenpaare X und Y in der invertierten DAPI-Färbung dargestellt.
- 2B Darstellung der beiden X und Y Chromosomen in der Farbkombination SpO, Cy5 und Cy5.5.

Patient 10, ohne Amifostin–Behandlung

30 MP zeigten zum Teil starke Veränderung der Chromosomen. Es fanden sich 11 komplexe chromosomale Aberrationen (in kursiv gedruckt). Eine Aneuplonie des #Y trat auf, es lag insgesamt 5 mal vor (**Abb. 3.36**). Die fettgedruckten Aberrationen sind in **Abb. 3.37–3.40** dargestellt.

Tab. 12 Chromosomale Aberrationen von Patient 10

Reziproke Translokationen	Translokationen	Dizentrische Chromosomen	Einfache Brüche
tr(1;10)	<i>t(1;16*) + t(8*;16)</i>	dic(1;6)	B“ 15
tr(4;12)	<i>t(3*;4) + t(3;4*) + N-dj</i>	dic(6;12)	B“ 12
tr(8;13)	<i>ace 3,4</i>	dic(1;17)	B“ 6
tr(1;16)	<i>t(11*;Y) + t(13;11;20*) +</i>	dic(1;20)	B“ 9
tr(22;Y)	<i>t(13*;11)+ t(20;22*)</i>	dic(4;8)	B“ 7
tr(17;22)	<i>t(14*;15) + t(14;20*) +</i>	dic(11;16)	B“ 8
tr(9;17)	<i>t(15*;20)</i>	dic(3;4)	B“ 12
tr(3;21)	<i>t(17;18*) + t(18;20*)</i>	dic(2;16)	B“ 3
tr(2;10)	<i>t(12;15*) + t(12*;15)</i>		B“ 5
tr(3;13)	t(1;10*)	<i>dic(6;18) +</i>	B“ 13
tr(2;6)	t(13*;18)	<i>t(18;21*) +</i>	
tr(14;19)	t(2*;17)	<i>t(21;22*)</i>	
tr(8;10)	t(6;15*)	<i>dic(1;2) +</i>	
	t(7;16*)	<i>t(1;2;1*;2;1)</i>	
	t(13*;16)	<i>dic(10;13) +</i>	
	t(2;17*)	<i>t(10;21*)</i>	
	t(15*;18)	<i>dic(2;3) + t(2*;3)</i>	
	t(1*;6)	dic(6;10) +	
	t(4;7*)	t(1*;10)	
	t(X*;6)		
	t(15*;22)		
	t(11;20*)		
	t(15;21*)		

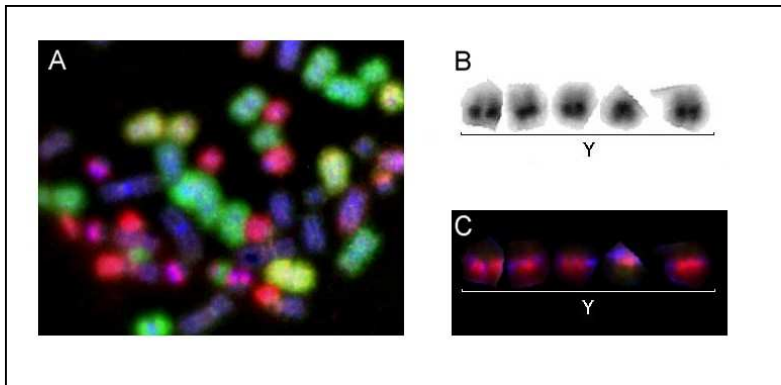


Abb. 3.36

Ohne Amifostin behandelt.
Aneuploidie, 5 mal #Y.

A Ausschnitt aus der MP P10 073, dargestellt mit der Farbkombination FITC, SpO und Cy5.5.

B Die 5 Y Chromosomen in der invertierten DAPI-Färbung dargestellt.

C Die 5 Y Chromosomen dargestellt mit der Farbkombination FITC, SpO und Cy5.5.

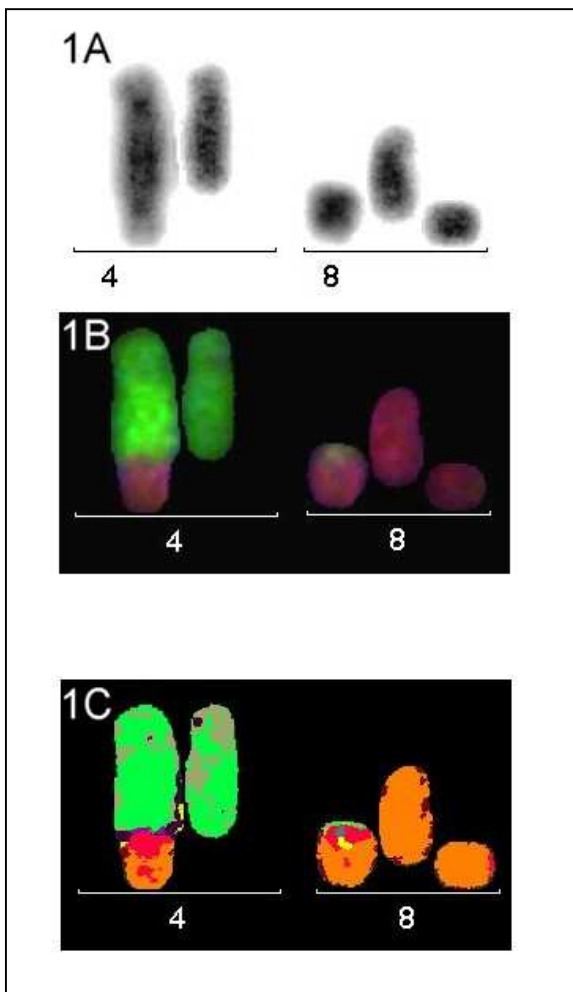


Abb. 3.37

Patient wurde ohne Amifostin behandelt.
Die Abbildung zeigt ein dizentrisches Chromosom.

dic (4;8) + ace 4;8 + Rest 4, 8 + ace 8

1A Darstellung der Chromosomenpaare 4 und 8 in der invertierten DAPI-Färbung. Das linke Chromosom hat 2 Zentromere. Eins von Chromosom 4 und eins vom Chromosom 8.

1B Darstellung der gleichen Chromosomen mit der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5. Ganz links bei den 8ern findet sich das azentrische Fragment 4;8, in der Mitte ist andere Chromosom 8 und ganz rechts findet sich noch ein azentrisches Fragment des Chromosoms 8.

1C Darstellung mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2.

Ergebnisse

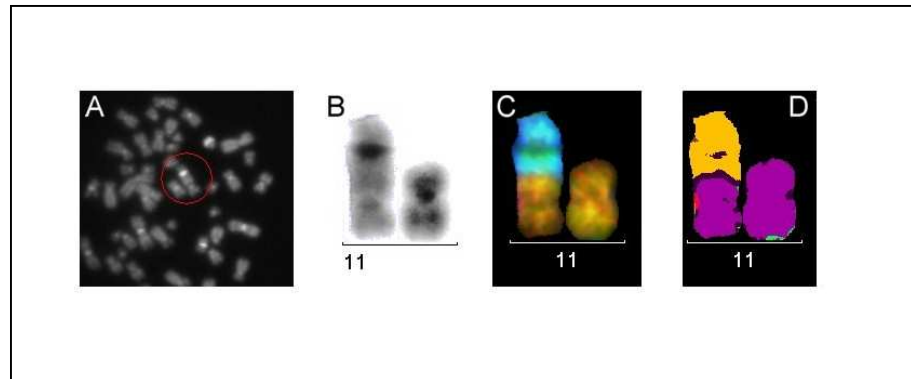


Abb. 3.38 Der Patient wurde ohne Amifostin behandelt.

Dieses Bild zeigt ein dizentrisches Chromosom, bestehend aus Anteilen des #11 und des #16.
dic(11;16), ace 11, 16 fehlen

- A Ausschnitt aus der Metaphase P10 108, rot umrandet ist das dizentrische Chromosom 11;16. Darstellung in der DAPI-Färbung.
- B Darstellung in der invertierten DAPI-Färbung. Bei dem rechten Chromosom sind beide Zentromere gut zu erkennen.
- C Darstellung der Chromosomen mit der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5.
- D Abbildung der Chromosomen mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2. Das 11er Chromosom ist in lila und das 16er Chromosom in orange dargestellt.

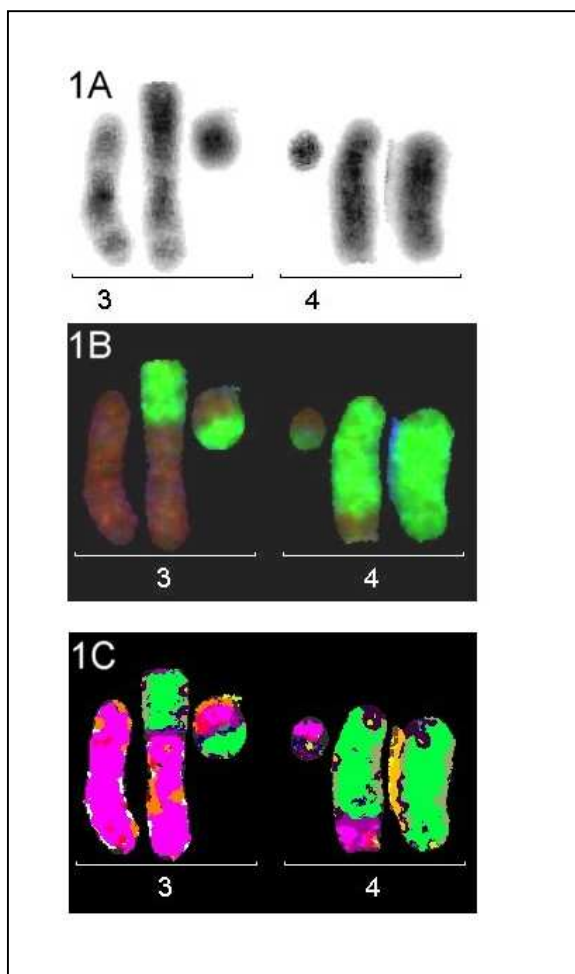


Abb. 3.39 Ohne Amifostin
t(3*;4) + ace 3;4 + t(3;4*) + Non-disjunction
ace 3;4

oder

tr(3;4) + 2 mal ace 3;4, Non-disjunction

- 1A Abbildung der Chromosomenpaare 3 und 4 in der invertierten DAPI-Färbung.
- 1B Darstellung der Chromosomen mit der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5. Das rechte #3 ist nicht gebrochen. Das Chromosom in der Mitte hat einen Bruch am kurzen Arm. Dort hat das azentrische Fragment des Chromosoms 4 gebunden. Weiter rechts folgen 2 azentrische Fragmente, die jeweils aus Anteilen des Chromosoms 3 und 4 bestehen. Sie können aufgrund von einer Non-disjunction entstanden sein. Das Chromosom 4 ist am langen Arm gebrochen und hat sich dort mit einem Fragment des gebrochenen Chromosoms 3 verbunden. Das #4 ganz rechts ist nicht gebrochen.
- 1C Abbildung der Chromosomen mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2.

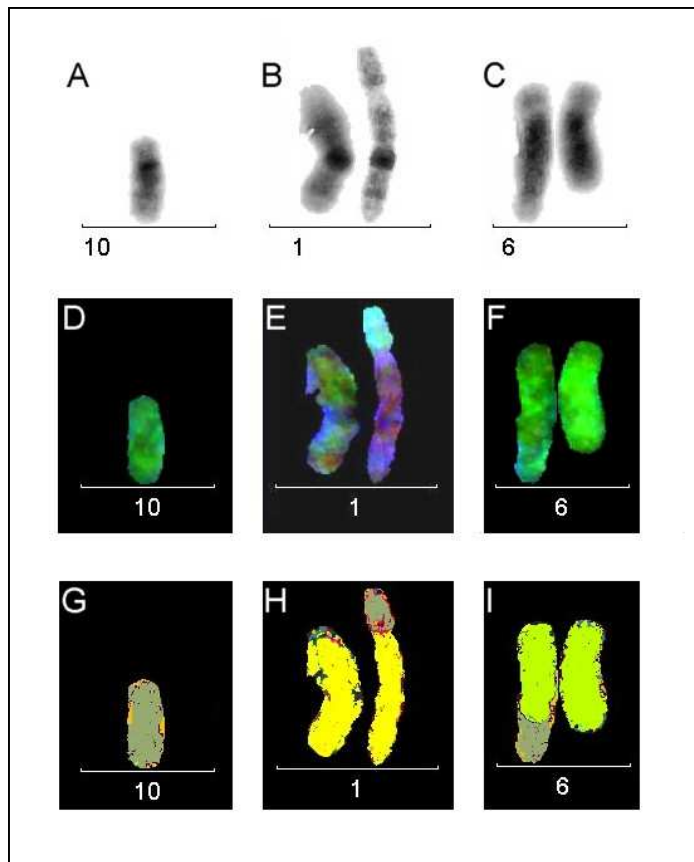


Abb. 3.40

Komplexes chromosomales Rearrangement, $t(1^*;10) + dic(6;10)$, ace 1, 6 fehlen.
Der Patient wurde ohne Amifostin behandelt.

In der ersten Reihe (A-C) sind die Chromosomenpaare 1, 6 und 10 in der invertierten DAPI-Färbung dargestellt. Eine Reihe darunter (D-F) zeigt die Chromosomen in der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5. In der untersten Reihe (G-I) sind die Chromosomen mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2 dargestellt.

- B Das rechte 1er Chromosom wirkt verlängert.
- C Das linke der beiden 6er Chromosomen besitzt zwei Zentromere. Eins vom Chromosom 6 und eins vom Chromosom 10.
- H In dieser Abbildung erkennt man, dass sich das Chromosom 1 mit dem azentrischen Fragment des Chromosoms 10 verbunden hat.
- I Das Fragment des 10er Chromosoms mit dem Zentromer hat sich mit dem gebrochenen Chromosom 6 verbunden.

Patient 11, mit Amifostin-Behandlung

32 MP wiesen chromosomale Aberrationen auf. #6 lag als Ringchromosom vor (**Abb. 3.41**). Die komplexen Rearrangements sind in kursiv gedruckt, die fettgedruckten Aberrationen sind in **Abb. 3.41–3.44** dargestellt.

Tab. 13 Chromosomale Aberrationen von Patient 11

Reziproke Translokationen	Translokationen	Dizentrische Chromosomen	Einfache Brüche	Andere Aberrationstypen
tr(1;18)	t(13;21*)	dic(18;22)	B“ 9	Inversionen
tr(X;3)	t(16;20*)	dic(2;14)	B“ 5	inv #7
tr(2;10)	t(1;12*)	dic(5;15)	B“ 9	
tr(6;8)	t(1*;16)	dic(5;7)	B“ 9	Ring #6
tr(2;7)	t(Y;15*)	dic(X;11)	B“ 2	
tr(3;6)	t(7*;10)	dic(2;4)	B“ 12	
tr(6;18)	t(2;6*)	dic(3;14)	B“ 2	
tr(2;15)		dic(6;10)	B“ 9	
tr(6;10)		dic(1;8)	B“ 3	
tr(4;14)			B“ 2	
tr(10;13)			B“ 1	
tr(1;12)			B“ 12	
tr(6;12)			B“ 17	
tr(1;2)			B“ 3 +	
tr(2;6)			<i>t(3;10*)</i>	
tr(1;6)			+	
			<i>t(10;18*)</i>	

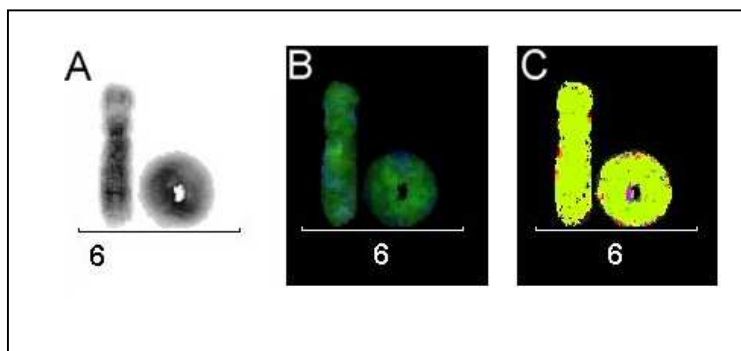


Abb. 3.41 mit Amifostin Ringchromosom 6. Das #6 ist 2x gebrochen und hat sich an den jeweiligen Enden wieder verbunden.

- A Invertierte DAPI-Färbung.
- B Darstellung in der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5.
- C Falschfarbendatei HURRA 2.

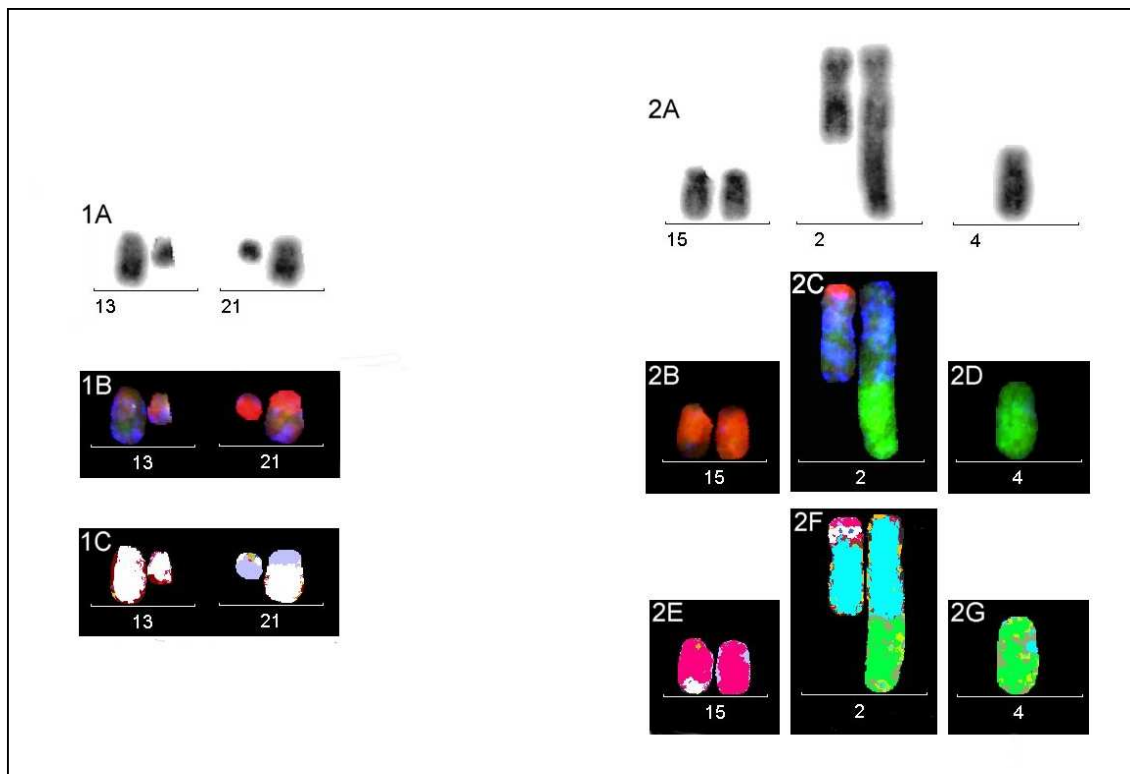


Abb. 3.42

Der Patient wurde mit Amifostin behandelt.

Die Chromosomenpaare 13, 21 und 15, 2, 4 in der obersten Reihe sind in der invertierten DAPI-Färbung dargestellt (1A, 2A). In der Reihe darunter sind die Chromosomen in der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5 dargestellt (1B, 2B-2D). In der untersten Reihe stellen sich die Chromosomen mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2 dar (1C, 2E-2G).

- 1A-1C $t(13;21^*) + \text{Rest } 13^* + \text{ace } 21 \text{ fehlt}$
 1B Das rechte Chromosom 13 ist gebrochen und das azentrische Fragment hat sich mit dem ebenfalls gebrochenen Chromosom 21 verbunden. Das azentrische Fragment des Chromosoms 21 fehlt.
- 2A-2G $tr(2;15)$
 $dic(2;4), \text{ ace } 4 \text{ fehlt}$
 2C Das linke Chromosom 2 ist am kurzen Arm gebrochen und hat sich mit dem azentrischen Fragment des Chromosoms 15 verbunden. Das am langen Arm gebrochene linke Chromosom 15 hat sich mit dem Fragment des gebrochenen linken Chromosoms 2 verbunden. Das rechte Chromosom 2 weist einen Bruch im langen Arm auf und hat sich dort mit dem Rest des gebrochenen Chromosoms 4 verbunden, so dass ein dizentrisches Chromosom entstanden ist. Das azentrische Fragment des Chromosoms 4 fehlt.

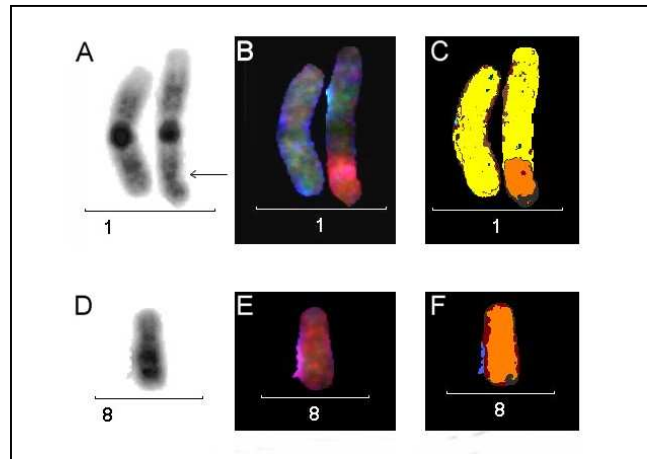


Abb. 3.43 Patient mit Amifostin behandelt.

Darstellung eines dizentrischen Chromosoms, dic(1;8), ace 1, 8 fehlen. In den Abbildungen A und D werden die Chromosomenpaare 1 und 8 in der invertierten DAPI-Färbung dargestellt.

Die mittleren Bilder (B, E) zeigen die Chromosomen in der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5. Die hintern beiden Abbildungen C und F zeigen die Chromosomen mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2.

- A Beim rechten Chromosom handelt es sich um ein dizentrisches Chromosom mit einem Zentromer des 1er und des 8er Chromosoms (siehe schwarzer Pfeil). Das azentrische Fragment des Chromosoms 8 und des Chromosoms 1 fehlt.

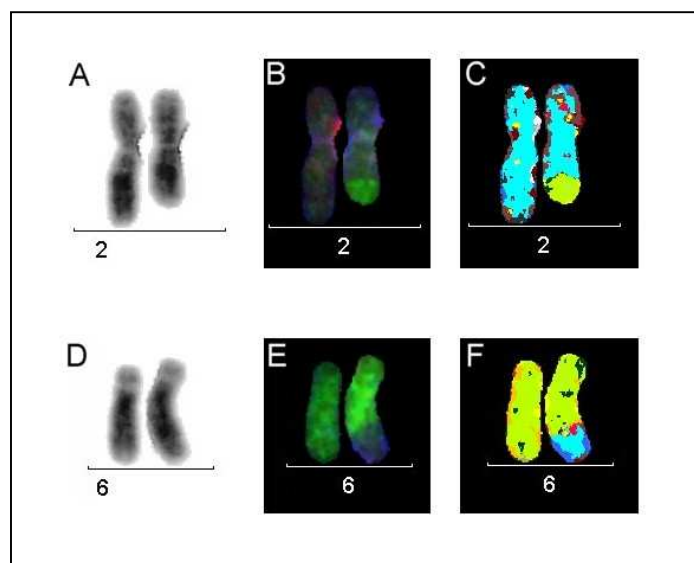


Abb. 3.44

Dieses Bild zeigt eine reziproke Translokation, tr(2;6). Patient wurde mit Amifostin behandelt. In den Abbildungen A und D werden die Chromosomenpaare 2 und 6 in der invertierten DAPI-Färbung dargestellt. Die mittleren Bilder (B, E) zeigen die Chromosomen in der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5. Die hintern beiden Abbildungen C und F zeigen die Chromosomen mit Hilfe der Falschfarbendatei HURRA 2.

- B Das rechte Chromosom 2 ist am langen Arm gebrochen und hat sich dort mit dem Fragment des ebenfalls gebrochenen Chromosoms 6 verbunden.
- E Das gebrochene rechte Chromosom 6 hat sich mit dem Fragment des Chromosoms 2 verbunden.

Patient 12, ohne Amifostin–Behandlung

In 21 MP traten strukturelle Veränderungen der Chromosomen auf. 2 mal kam es zu einer Non–disjunction des #Y (**Abb. 3.46**). Eine Trisomie des #21 konnte in **Abb. 3.45** dargestellt werde. Die komplexen Rearrangements sind in kursiv gedruckt, die fettgedruckten Aberrationen sind in **Abb. 3.47–3.49** dargestellt.

Tab. 14 Chromosomale Aberrationen von Patient 12

Reziproke Translokationen	Translokationen	Dizentrische Chromosomen	Einfache Brüche	Andere Aberrationstypen
tr(4;9)	<i>t(1;17*) +</i>	dic(1;14)	B“ 6	Inversionen
tr(6;20)	<i>t(17;20*)</i>		B“ 16	inv #2
tr(4;21)			B“ 5	
tr(1;10)	<i>t(18*;12;18)</i>		B“ 1	
tr(5;7)			B“ 12	
tr(2;7)	<i>t(2*;6) + t(6*;20)</i>		B“ 14	
			B“ 1	
	<i>t(11*;17)</i>		B“ 2	
	<i>t(3;7*)</i>		B“ 6	
	<i>t(3*;20)</i>		B“ 11	
	<i>t(9;12*)</i>		B“ 5	
	<i>t(20;21*)</i>		B“ 19	
			B“ 2	
			B“ 15	
			B“ 12	
			B“ 13	
			B“ 5	
			B“ 6	
			B“ X	

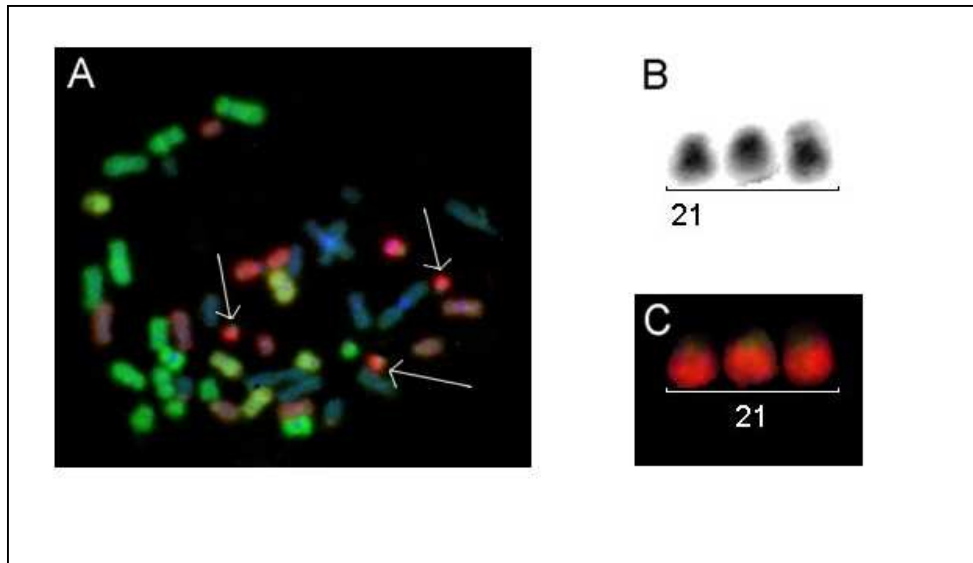


Abb. 3.45

Trisomie 21, bei sonst unauffälligem Karyotyp, 46, XY, des Patienten. Der Patient wurde ohne Amifostin behandelt.

- A Abbildung der Metaphase P12 006 in der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5. Die weißen Pfeile kennzeichnen die drei Chromosomen 21.
- B Darstellung der Chromosomen in der invertierten DAPI-Färbung.
- C Darstellung der Chromosomen in der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5.

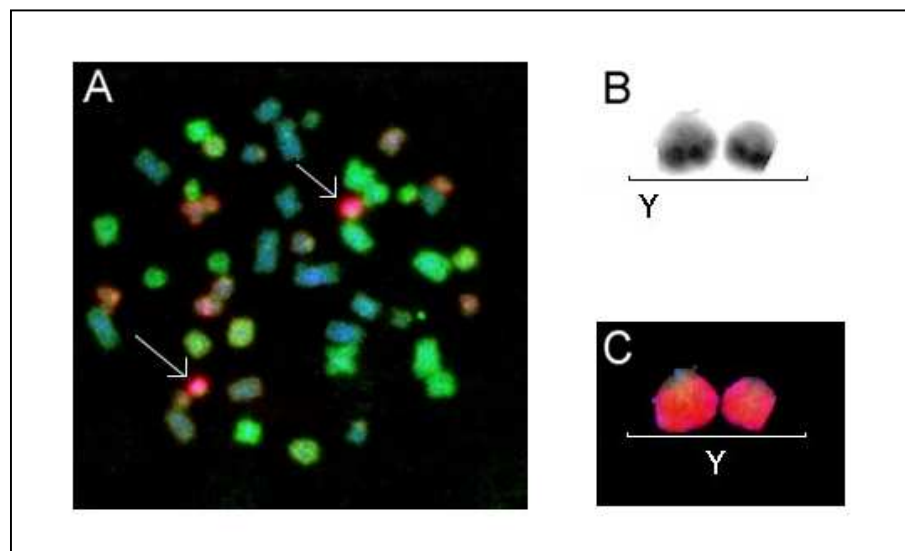


Abb. 3.46 Patient wurde ohne Amifostin behandelt.

Non-disjunction Y, 47, XYY, bei sonst unauffälligem Karyotyp, 46, XY, des Patienten.

- A Abbildung der Metaphase P12 102 in der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5. Die weißen Pfeile kennzeichnen die zwei Y Chromosomen.
- B Darstellung der Chromosomen in der invertierten DAPI-Färbung.
- C Darstellung der Chromosomen in der Farbkombination FITC, TR und Cy5.5.

Ergebnisse

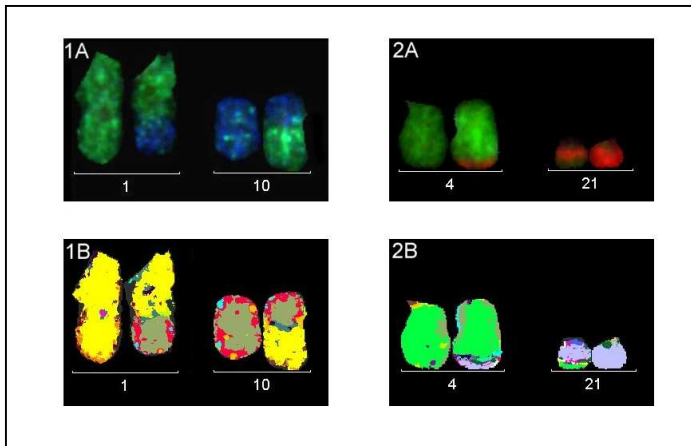


Abb. 3.47

Ohne Amifostin-Behandlung.

Reziproke Translokationen

MP051 tr(1;10)

1A Farbkombination SpO,
Cy5, Cy5.5.

1B Falschfarbendatei
HURRA 2.

MP044 tr(4;21)

2A Farbkombination FITC,
TR, Cy5.5.

2B Falschfarbendatei
HURRA 2.

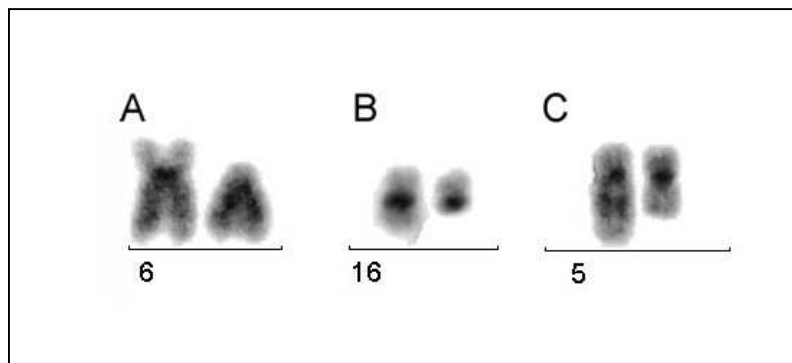


Abb.3.48 Patient wurde ohne Amifostin behandelt.

Einfache Brüche, Darstellung der Chromosomen in der invertierten DAPI-Färbung.

A Chromosom 6, Bruch im kurzen Arm, das azentrische Fragment fehlt.

B Chromosom 16, Bruch im langen Arm, das azentrische Fragment fehlt.

C Chromosom 5, Bruch im langen Arm, das azentrische Fragment fehlt.

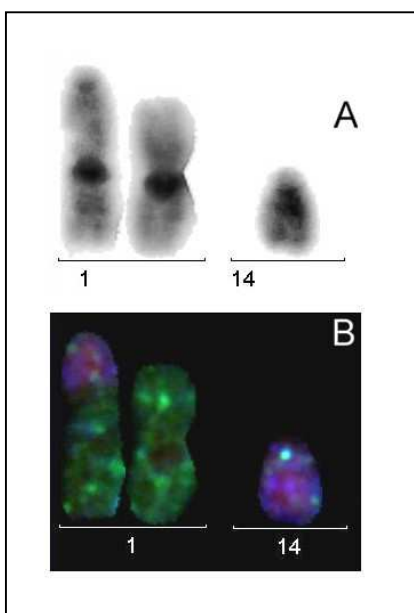


Abb. 3.49 Patient wurde ohne Amifostin behandelt.

Darstellung eines dizentrischen Chromosoms.
dic(1;14), ace 1, 14 fehlen

- A Darstellung der Chromosomenpaare 1 und 14 in der invertierten DAPI-Färbung. Das rechte Chromosom ist ein dizentrisches Chromosom, das aus Teilen des 1er sowie des 14er Chromosoms besteht. Die azentrischen Fragmente der Chromosomen 1 und 14 fehlen.
- B Darstellung der Chromosomen in der Farbkombination SpO, Cy5 und Cy5.5.

3.2 Auswertung / Statistik

24–Farben–FISH wurde auf 1200 Metaphasen angewandt (12 Patienten, 100 Metaphasen pro Patient). 2–3 Jahre nach der *in vivo* Radiochemotherapie zeigte diese Methode bei jedem Patienten eine starke Erhöhung an Lymphozyten, deren Zellkerne chromosomale Schäden enthielten.

Tab. 15 Übersicht über die chromosomalen Veränderungen der 12 Patienten

Fälle	Amifostin	Aberr. MP	B/100 MP	T	Tr	Dic	CCR	Inv/Ring	B
P1	500 mg/d	22	76	6	9	6	6	3	5
P2	500 mg/d	18	51	9	7	5	2	0	3
P3	–	13	31	4	3	1	2	0	7
P4	500 mg/d	28	78	14	12	3	2	2	9
P5	500 mg/d	28	97	12	18	0	6	2	9
P6	–	23	70	10	13	3	3	1	4
P7	500 mg/d	13	38	7	6	2	0	1	5
P8	500 mg/d	14	32	2	8	0	1	1	5
P9	–	35	100	9	27	7	2	2	4
P10	–	30	125	14	13	8	11	0	10
P11	500 mg/d	32	84	7	16	9	1	2	13
P12	–	21	54	5	6	1	3	1	19

In **Tab. 15** sind die 12 Patienten, sowie die Menge ihrer Amifostininfusion aufgelistet. Es wurde dargestellt, wie viele Metaphasen (MP) von je 100 untersuchten MP chromosomale Aberrationen aufwiesen (Aberr. MP), wieviele Brüche insgesamt festgestellt wurden (B/100 MP), die Anzahl der einfachen (T) und reziproken (Tr) Translokationen, die Anzahl der dizentrischen Chromosomen (Dic), die Anzahl der komplexen chromosomalen Rearrangements (CCR), sowie die Anzahl der Inversionen / Ringchromosomen (Inv/Ring) und der einfachen Brüche (B).

Ergebnisse

Die folgende Abbildung zeigt grafisch die Auswertung der Chromosomenbrüche insgesamt (**Abb. 3.50**, dunkelrote Säule) und die Anzahl der Metaphasen, die chromosomale Veränderungen aufwiesen (**Abb. 3.50**, blaue Säule).

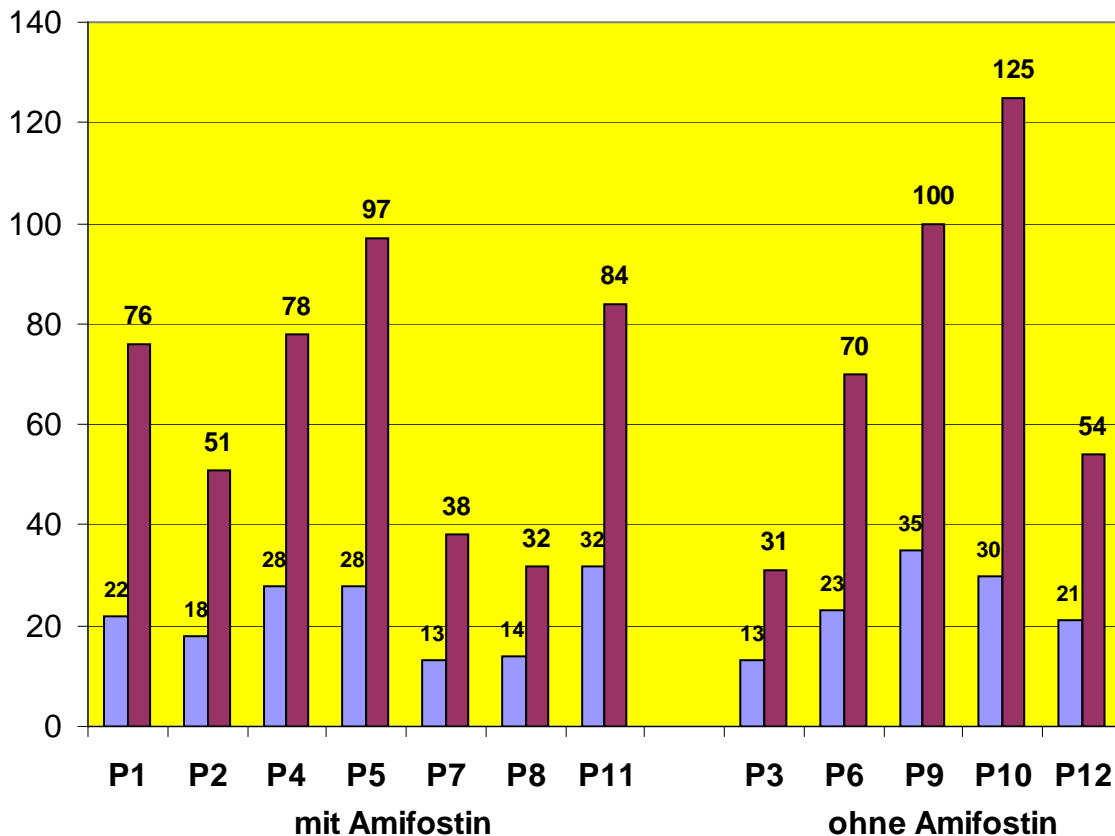


Abb. 3.50 Gesamtzahl der in 100 Metaphasen pro Patient gefundenen Bruchereignisse (B/100 MP; dunkelrot) und Gesamtanzahl der Aberrationen enthaltenen Zellen pro Patient (blau) (P1–P12 24-Farben-FISH-Analyse) (nach Kuchler et al., 2003; modifiziert).

Die Patienten P1, P2, P4, P5, P7, P8 und P11 sind zusätzlich mit Amifostin behandelt worden. Hinsichtlich der durchschnittlichen Anzahl von Brüchen pro Mitose (B/M) in jeder der beiden Gruppen, war kein signifikanter Unterschied an chromosomalen Residualschäden feststellbar (mit Amifostin 0,65 B/M in Vergleich zu 0,76 B/M ohne Amifostin). Auch die durchschnittliche Rate aberranter Zellen von 100 ausgewerteter Metaphasen war in beiden Gruppen etwa gleich (mit Amifostin 22,1 versus 24,4 ohne Amifostin).

Die Auswertung der durchschnittlichen Anzahl von Brüchen pro Mitose (B/M) zeigte einen erhöhten Anteil chromosomaler Residualschäden, sowohl in der mit Amifostin (0,65 B/M [0,32–0,97]) als auch in der ohne Amifostin behandelten Patientengruppe (0,76 B/M [0,31–1,25]) (siehe **Abb. 3.50** und **Tab. 15**). Auch der durchschnittliche Anteil von Zellen, die Aberrationen enthielten, war bei 100

Ergebnisse

Metaphasen etwa gleich. 22,1 (13–32) mit Amifostin versus 24,4 (13–35) ohne Amifostin (siehe **Abb. 3.50**).

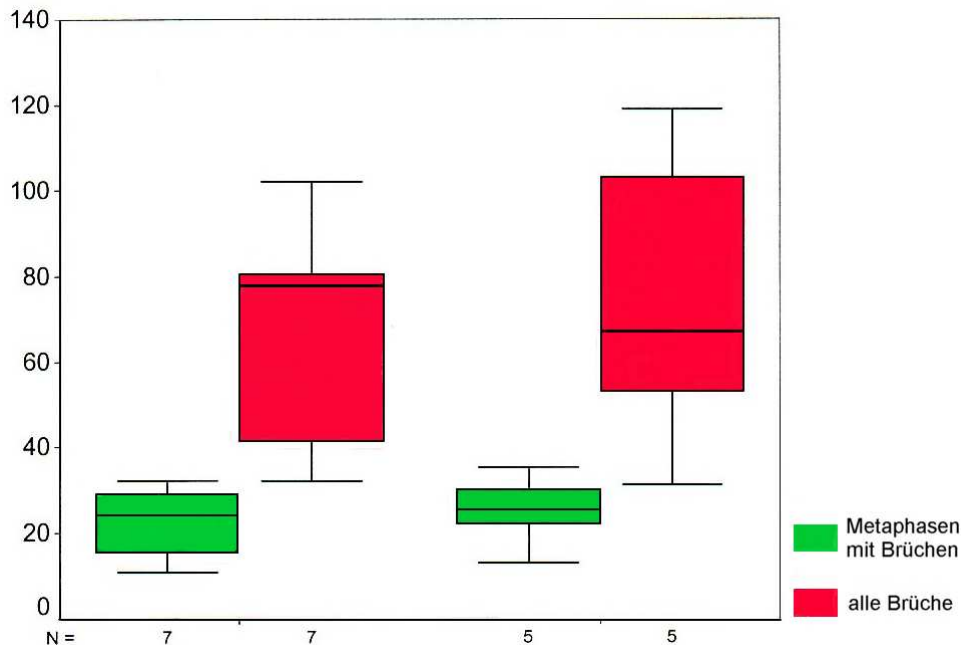


Abb. 3.51

Boxplot der Metaphasen mit chromosomalen Schäden (von 100 Metaphasen), in grün dargestellt. Boxplot der gesamten Anzahl der Brüche in 100 Metaphasen, in rot dargestellt. Links ist die Patientengruppe dargestellt, die mit Amifostin behandelt wurde (7 Probanden). Rechts die Patientengruppe, die ohne zusätzliche Amifostingabe behandelt wurde (5 Probanden).

Zwischen den zwei verschiedenen Patientengruppen gab es nur geringe Variationen, in Bezug auf die Häufigkeit der chromosomalen Schäden.

Da die Gruppen nicht „Normal verteilt“ waren, wurde als nichtparametrischer Test der Mann–Whitney–U Test durchgeführt (siehe **Abb. 3.51**), um die Unterschiede der beiden Gruppen zu beschreiben. Beim Vergleich des Anteils der Metaphasen, die chromosomale Schäden enthielten, zwischen den beiden Gruppen, gab es keine signifikanten Unterschiede ($p= 0,619$, in grün dargestellt).

Auch der Vergleich der Brüche insgesamt zwischen den beiden Gruppen (in rot dargestellt), erbrachte keine signifikanten Unterschiede ($p= 0,755$). Das Signifikanzniveau war auf $p < 0,05$ festgelegt.

Ergebnisse

Abbildung 3.52 a) bis f) geben einen Überblick über die in der Studie gefundenen Aberrationen.

3.2.1 Einfache Doppelstrangbrüche

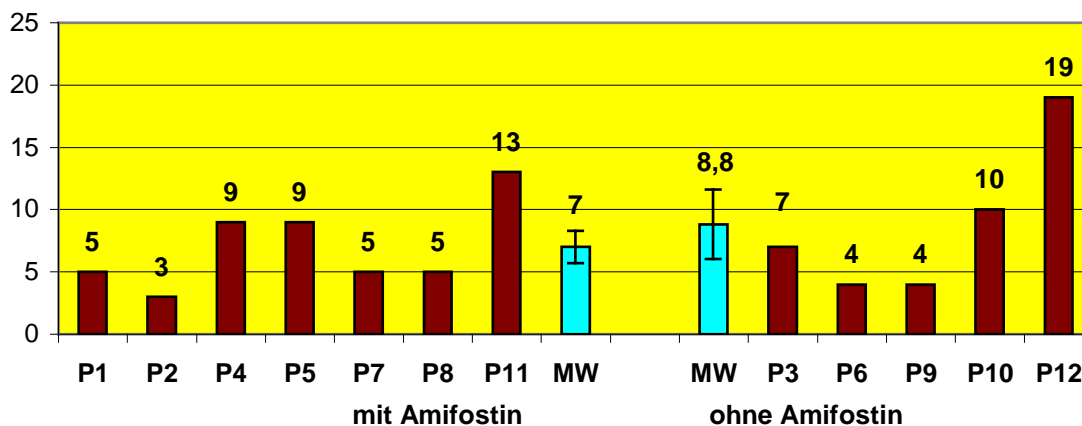


Abb. 3.52 a In dieser Abbildung ist die Anzahl der einfachen Doppelstrangbrüche pro 100 Metaphasen dargestellt (nach Kuchler et al., 2003; modifiziert). Die Patienten, die Amifostin erhalten hatten sind auf der linken Seite dargestellt. In der Mitte zwischen den beiden Gruppen sind die jeweiligen Mittelwerte (MW, hellblaue Balken) aus den Gruppen abgebildet. Als Fehlerbalken ist der Standardfehler eingetragen. Standardfehler bei der Amifostingruppe: +/- 1,3 versus +/- 2,7 bei der unbehandelten Gruppe.

3.2.2 Reziproke Translokationen

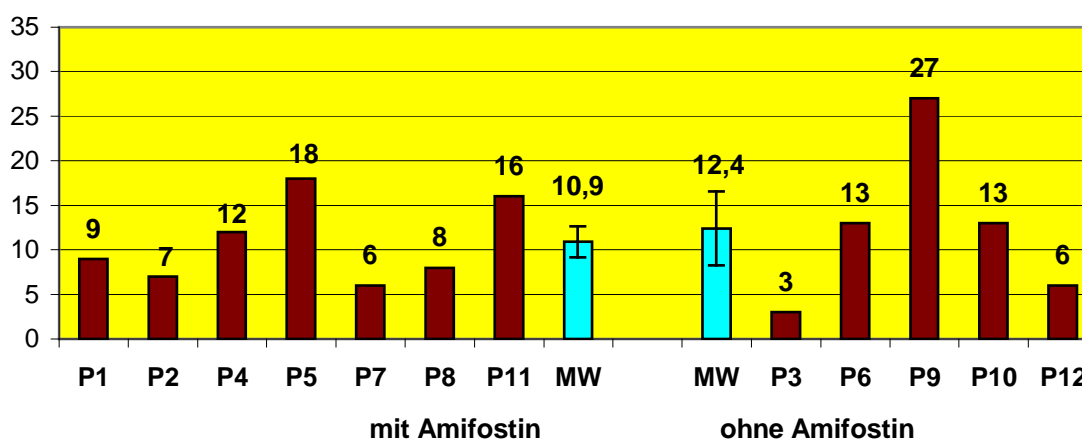


Abb. 3.52 b Darstellung der Anzahl der reziproken Translokationen (nach Kuchler et al., 2003; modifiziert). Die Patienten, die Amifostin erhalten hatten sind auf der linken Seite dargestellt. In der Mitte zwischen den beiden Gruppen sind die jeweiligen Mittelwerte (MW, hellblaue Balken) aus den Gruppen abgebildet. Als Fehlerbalken ist der Standardfehler eingetragen. Standardfehler bei der Amifostingruppe: +/- 1,8 versus +/- 4,1 bei der unbehandelten Gruppe.

3.2.3 Einfache Translokationen

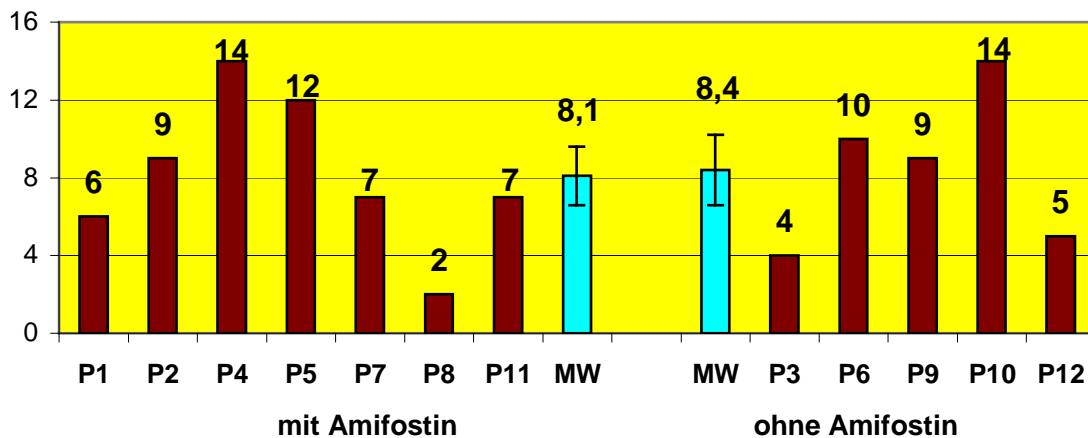


Abb. 3.52 c Darstellung der Anzahl der einfachen Translokationen (nach K uchler et al., 2003; modifiziert). Die Patienten, die Amifostin erhalten hatten sind auf der linken Seite dargestellt. In der Mitte zwischen den beiden Gruppen sind die jeweiligen Mittelwerte (MW, hellblaue Balken) aus den Gruppen abgebildet. Als Fehlerbalken ist der Standardfehler eingetragen. Standardfehler bei der Amifostingruppe: +/- 1,5 versus +/- 1,8 bei der unbehandelten Gruppe.

3.2.4 Inversionen und Ringchromosomen

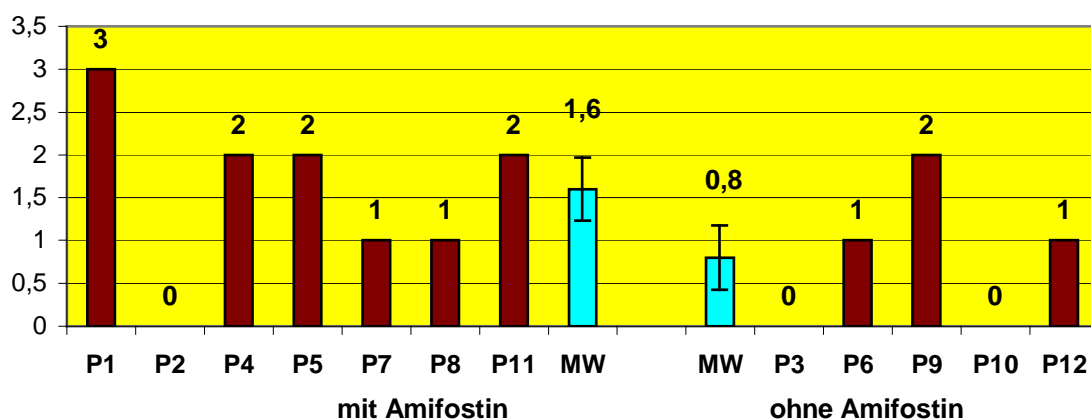


Abb. 3.52 d Darstellung der Anzahl der Inversionen und Ringchromosomen (nach K uchler et al., 2003; modifiziert). Die Patienten, die Amifostin erhalten hatten sind auf der linken Seite dargestellt. In der Mitte zwischen den beiden Gruppen sind die jeweiligen Mittelwerte (MW, hellblaue Balken) aus den Gruppen abgebildet. Als Fehlerbalken ist der Standardfehler eingetragen. Standardfehler bei der Amifostingruppe: +/- 0,4 versus +/- 0,4 bei der unbehandelten Gruppe.

3.2.5 Dizentrische Chromosomen

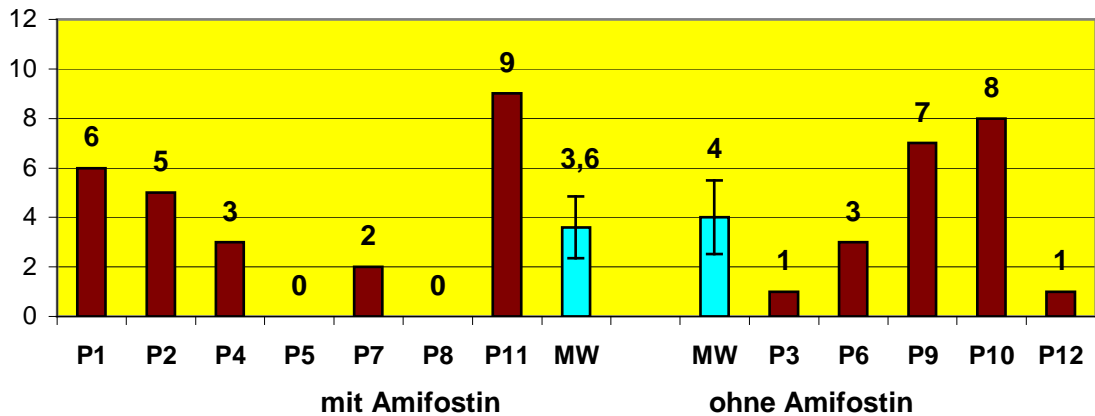


Abb. 3.52 e Darstellung der Anzahl der dizentrischen Chromosomen (nach K uchler et al., 2003; modifiziert). Die Patienten, die Amifostin erhalten hatten sind auf der linken Seite dargestellt. In der Mitte zwischen den beiden Gruppen sind die jeweiligen Mittelwerte (MW, hellblaue Balken) aus den Gruppen abgebildet. Als Fehlerbalken ist der Standardfehler eingetragen. Standardfehler bei der Amifostingruppe: +/- 1,3 versus +/- 1,5 bei der unbehandelten Gruppe.

3.2.6 Komplexe chromosomale Rearrangements

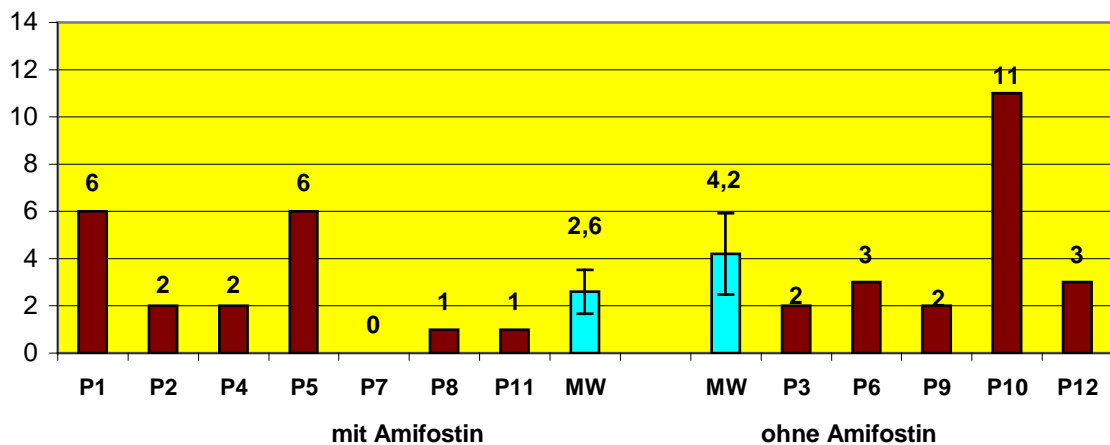


Abb. 3.52 f Darstellung der Anzahl der komplexen chromosomalen Rearrangements (nach K uchler et al., 2003; modifiziert). Die Patienten, die Amifostin erhalten hatten sind auf der linken Seite dargestellt. In der Mitte zwischen den beiden Gruppen sind die jeweiligen Mittelwerte (MW, hellblaue Balken) aus den Gruppen abgebildet. Als Fehlerbalken ist der Standardfehler eingetragen. Standardfehler bei der Amifostingruppe: +/- 0,9 versus +/- 1,7 bei der unbehandelten Gruppe.

Ergebnisse

Die aufgetretenen Aberrationstypen (einfache Translokationen, reziproke Translokationen, Brüche, dizentrische Chromosomen, Inversionen, Ringchromosomen und komplexe chromosomale Rearrangements) zeigten keine signifikante Häufung in einer der beiden Gruppen. Es lässt sich lediglich ein leichter Trend beobachten, da fast alle Aberrationsformen etwas seltener in der mit Amifostin behandelten Patientengruppe vorkommen.

Wenn man nur die Zellen betrachtet, die Aberrationen aufweisen, dann beinhaltet jede Zelle im Durchschnitt 2,9 Brüche (mit Amifostin) und 3,0 Brüche (ohne Amifostin).

3.2.7 Klonale Aberrationen

Es konnten keine klonalen Aberrationen dargestellt werden.

3.2.8 Mitotische Non-disjunctions

Neben den bekannten Aberrationstypen (einfache / komplexe Translokationen, azentrische, dizentrische Chromosomen, Insertionen, Inversionen und Ringen) fanden sich in 20 von 1200 MP Aberrationen, die mit einem Zugewinn an chromosomalem Material innerhalb der Zelle verbunden waren. So lagen zum Beispiel in einer Zelle 4 zusätzliche Y-Chromosomen vor (**Abb. 3.36**), es kam zu Trisomien des Chromosoms 21 (**Abb. 3.45** und **Abb. 3.10**) oder das Y Chromosom lag in zweifacher Kopie vor, 47,XYY (**Abb. 3.2** und **Abb. 3.46**) bei sonst normalem Chromosomensatz des Patienten 46,XY.

Es fanden sich Zellen, in denen identische Kopien, komplex translozierter Markerchromosomen vorlagen (siehe **Abb. 3.19** und **Abb 3.39**), die sich eigentlich nur durch mitotische Non-disjunctions erklären lassen (siehe Kuechler et al., 2001).

So wurde eine neue Aberrationsform nach Radiochemotherapie und Amifostin-Behandlung gefunden und beschrieben, die mitotischen Non-disjunctions.

Diskussion

4.1 Fragestellung

In dieser Arbeit geht es darum, die nachgewiesene (siehe zusammenfassende Darstellung bei Rieth et al., 1996 und Brizel, 2001) radioprotektive Wirkung von Amifostin nicht auf klinischer sondern auf genetischer bzw. chromosomaler Ebene zu untersuchen.

Durch eine Vielzahl von klinischen Studien wurde bereits belegt, dass Amifostin normales, gesundes Gewebe schützt und Nebenwirkungen, die durch Bestrahlung und Chemotherapie entstehen, abschwächt (Buntzel et al., 1998, Trog et al., 1999 und Wasserman et al., 2000).

Eine vorangehende Studie (Dunst et al., 2000) analysierte die klinischen Nebenwirkungen der Radiochemotherapie bei Rektumkarzinompatienten mit und ohne Zugabe von Amifostin bei 30 Patienten. Es zeigte sich klinisch ein signifikanter Unterschied.

Die Patienten, die gleichzeitig mit Amifostin behandelt wurden, entwickelten weniger Hautreaktionen und Darmstörungen gegenüber den Patienten, die kein Amifostin vor der Bestrahlung erhielten. Dieses Ergebnis stimmte mit anderen klinischen Studien überein (Spath-Schwalbe et al., 2002, Trog et al., 1999 und Wasserman et al., 2000). Von Dunst et al. (2000) wurde angenommen, dass schon die Applikation einer relativ geringen Menge Amifostin über eine kurze Zeit ausreicht, um die auftretenden Nebenwirkungen bei einer 5-FU Chemotherapie, abzuschwächen.

Andere Studien, die Amifostin die Fähigkeit zuschreiben, auch auf das Knochenmark protektiv wirken zu können, orientierten sich vornehmlich an klinischen Symptomen. Die myeloprotektiven Effekte des Amifostins resultieren aus einer verbesserten Hämatopoese, die sich klinisch als ein verbessertes Blutbild bemerkbar macht (Auletta und Shurin, 1999). Eine schützende Wirkung des Amifostins gegen chromosomale Aberrationen nach Bestrahlung, war bisher nur *in vivo* an Mäusen (Devi et al., 1998), oder an menschlichem Knochenmark unter *in vitro* Bedingungen (List et al., 1998), dokumentiert worden.

Diskussion

Da bislang keine Untersuchungen darüber vorlagen, ob Amifostin einen Einfluss auf die chromosomalen Veränderungen nach einer Radiochemotherapie in humanen Blutzellen unter *in vivo* Bedingungen besitzt, war es Ziel dieser Studie herauszufinden, ob der protektive Effekt des Amifostins auch auf chromosomaler Ebene zu beobachten sei.

Die durchgeführten Untersuchungen weisen darauf hin, dass Amifostin sich nicht auf genetischer bzw. chromosomaler Ebene protektiv auswirkt. Es konnte kein statistisch gesicherter Unterschied in der Häufung der chromosomalen Aberrationen zwischen den beiden unterschiedlich behandelten Patientengruppen dargestellt werden. Die Diskrepanz zwischen der klinischen Wirkung des Amifostins, zum Beispiel der Abschwächung der akuten Hautreaktionen, und der gefundenen chromosomalen Schäden, könnte zum Einen durch die zytoprotektive Wirkung des Amifostins (siehe **1.1.1**) oder zum Anderen auch durch spezifische Gewebeeigenarten erklärt werden. Rosen et al. (1999) beschreiben die Möglichkeit, dass die Neigung zu Entzündungsreaktionen oder die Zytokinproduktion eine große Rolle in der Entwicklung von Nebenwirkungen im bestrahlten Hautareal spielen können.

Amifostin hat auf klinischer Ebene eine bekannte protektive Wirkung, auf „genetischer“ Ebene hingegen nicht. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die gewünschte zellschädigende Wirkung der Radiochemotherapie selbst durch Amifostin nicht direkt beeinflusst wird. Da die Zahl der untersuchten Patienten allerdings relativ gering ist ($n = 12$) kann diese Untersuchung lediglich als Pilotstudie angesehen werden, die in ihren Ergebnissen einer Bestätigung bedarf.

Des Weiteren wurde mit dieser Arbeit das Ziel verfolgt herauszufinden, ob Jahre nach einer Radiochemotherapie noch chromosomale Residualschäden im Blut der Patienten nachweisbar seien, und um welche Art von Aberrationen es sich dabei handelt.

Diese Frage konnte in der vorliegenden Arbeit sehr gut beantwortet werden. Im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollpersonen, die eine chromosomale Bruchwahrscheinlichkeit von 0,00 bis 0,05 Brüchen pro Metaphase aufweisen, wurden bei den hier untersuchten Patienten zahlreiche chromosomale Aberrationen, struktureller und auch numerischer Art gefunden und beschrieben. Zusätzlich konnte eine neue Art von chromosomalen Aberrationen nach Radiochemotherapie und Behandlung mit Amifostin beschrieben werden, mitotische Non-disjunctions, in Form von identischen Kopien komplex translozierter Chromosomen (siehe **Abb. 3.19**).

4.2 Kritische Auseinandersetzung mit der Methodik

4.2.1 Patienten

Von 30 Patienten, die zwischen September 1997 und Oktober 1998 während einer Radiochemotherapie an einer Amifostinstudie teilgenommen hatten (Dunst et al., 2000), erklärten sich 12 Patienten bereit, an dieser weiterführenden Studie teilzunehmen (siehe auch **2.1**).

Es lag keine randomisierte Patientengruppe vor, die grundlegenden Bedingungen beider Patientengruppen waren allerdings vergleichbar. Das Durchschnittsalter der Patienten lag mit 58 Jahren (von 52 Jahren bis 72 Jahren) relativ dicht beieinander, jedoch konnte nicht jedem Patienten aus der Amifostingruppe ein gleichaltriger Patient aus der ohne Amifostin behandelten Gruppe gegenübergestellt werden. Alle Patienten hatten eine ähnliche Diagnose und sind, mit Ausnahme der Amifostingabe, nach dem gleichen Behandlungsschema therapiert worden.

Auf spezielle Eigenschaften der Patienten, die eventuell auch Einfluss auf die Regeneration von DNA haben könnten, wie z. B.: Essgewohnheiten, Gewicht, Raucher / Nichtraucher, Vitamin C Versorgung, allgemeine Grunderkrankungen etc., konnte in dieser Studie nicht weiter eingegangen werden.

Da das Patientenkollektiv lediglich 12 Patienten umfasst, ist es schwierig ein repräsentatives Ergebnis bezüglich der Wirksamkeit des Amifostins auf chromosomaler Ebene zu erhalten. Da es sich um eine retrospektive Erhebung

handelt, ergab sich allerdings nicht die Möglichkeit, mehr Patienten in die Untersuchung aufzunehmen. Doch auch schon dieses kleine Patientenkollektiv zeigte eindrücklich die erhöhte Aberrationshäufigkeit von Chromosomen noch Jahre nach einer *in vivo* Radiochemotherapie, verglichen mit unbestrahlten Personen, bei denen die Aberrationshäufigkeit der Chromosomen im Promillebereich liegt (Kuechler et al., 2002, Hassold et al., 1996).

4.2.2 Zeitraum Radiochemotherapie und Studie

Die Zeiträume zwischen Therapie und Blutabnahme für diese Studie variierten zwischen 26,5 (**Patient 5**) und 38 (**Patient 6**) Monaten. Im Schnitt waren es 30,5 Monate. Da sich aber weder im kürzeren noch im längeren Zeitraum nach der Bestrahlung eine erheblich abweichende Anzahl an chromosomalen Aberrationen nachweisen lässt (**P5** 28MP/100MP zu **P6** 23MP/100MP wiesen Schäden auf), wurde auf eine Angleichung der Zeiträume durch eine erneute Probenentnahme verzichtet.

Kritisch anzumerken ist allerdings, dass es leider keine Anfangsdaten der Patienten vor der Bestrahlung gab, um die spontane Translokationsrate des einzelnen Patienten ermitteln zu können. Es wurde allerdings bei keinem der Patienten eine klinische Überreaktion während der Radiochemotherapie beobachtet (Dunst et al., 2000), was eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit bei den untersuchten Patienten unwahrscheinlich macht.

4.2.3 Untersuchungsmaterial

Zum Nachweis der chromosomalen Residualschäden 2–3 Jahre nach der Radiochemotherapie, wurden in der vorliegenden Studie die Lymphozyten der Patienten als Untersuchungsmaterial herangezogen.

Es ist schon seit langem bekannt, dass chromosomale Residualschäden nach Bestrahlung in peripheren Lymphozyten nachweisbar sind (Huber et al., 1999, Kleinerman et al., 1989). In der Literatur ist beschrieben, dass Lymphozyten mit stabilen, persistierenden chromosomalen Schäden von Stammzellen

abstammen können, die eine Ganzkörperbestrahlung überlebt hatten (Heinze et al., 1995, Schmidberger et al., 2001). Nach partieller Bestrahlung zirkulieren im Blut bestrahlte und nicht bestrahlte Lymphozyten (Gershkevitch et al., 2002, Schmidberger et al., 2001). Abhängig von der Überlebenszeit der Lymphozyten gibt es immer original bestrahlte Zellen, aber auch aberrante Zellen, die von bestrahlten Lymphozyten abstammen. Diese Gruppen nehmen mit der Zeit ab. Diese Verringerung betrifft vor allen Dingen Zellen mit unstabilen Aberrationen, wie z.B. dizentrische Chromosomen, Brüche und azentrische Fragmente, die mit der Zellteilung verloren gehen (Bauchinger 1998).

Die Blutproben der 12 Patienten wurden nach dem herkömmlichen Standard abgenommen und aus Halle übersandt. Sie kamen alle unbeschädigt im Institut für Humangenetik in Jena an und ließen sich nach den beschriebenen Methoden problemlos kultivieren (siehe Material und Methoden **2.1.2**). Durch die Kultivierung über 72 Stunden, muss davon ausgegangen werden, dass ein Teil der analysierten Zellen schon ihre zweite mitotische Teilung hinter sich haben (siehe: www.mta-verband.at). Deshalb können schon einige Zellen mit Aberrationen während der ersten Zellteilung verloren gegangen sein, die sich nicht mehr nachweisen lassen. Dies wird vor allen Dingen für die unstabilen Aberrationen der Fall sein. Trotzdem konnte diese Art von Aberrationen in dieser Studie aber immer noch nachgewiesen werden.

4.2.4 Färbetechnik / Visualisierung der Chromosomen

Die Chromosomen der 12 Patienten wurden mittels 24-Farben-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungstechnik (24-Farben-FISH) markiert (siehe Material und Methoden **2.1.6**), da sich diese Methode dazu eignet, chromosomale Umbauten sichtbar zu machen (Gebhart et al., 1996, Huber et al., 1999 und Verdorfer et al., 2001).

Der Einsatz anderer Färbemethoden wie z. B. das Multi-Color-Banding oder die Giemsa Färbung wären prinzipiell auch möglich gewesen. Doch die Auswertung von mehr als 1000 Metaphasen wären mit diesen Färbungen

ungemein aufwendiger gewesen. Hätte es klonale Veränderungen an den Chromosomen der Patienten gegeben, wären diese Methoden geeignet gewesen, um die chromosomalen Bruchpunkte präzise zu definieren.

4.2.5 Auswertung

Die Auswertung der 12 verschiedenen Probanden erfolgte als Blindversuch, damit nicht bereits während der Untersuchung speziell auf Metaphasen mit chromosomalen Auffälligkeiten selektiert wurde. 100 Metaphase-Kerne wurden pro Patient karyotypisiert und ausgewertet (siehe **2.2**). Unklare Fälle wurden durch zwei unabhängige, erfahrene Untersucher analysiert. Als Untersuchungsstandard wurden 100 Metaphasen pro Patient festgelegt, da davon ausgegangen wurde, dass diese Anzahl ausreicht, um chromosomale Schäden zu finden und um einen guten Vergleichswert für alle Patienten zu haben. Somit wurden 4600 Chromosomen pro Patient untersucht. Die Auswertung verlief problemlos, alle chromosomalen Aberrationen waren sehr gut darstellbar.

4.3 Kritische Auseinandersetzung mit den Ergebnissen

Trotz unserer Annahme eines Chromosomen-protektiven Effektes des Amifostins, fand sich 2–3 Jahre nach Abschluss der Radiochemotherapie, ein erhöhter Schaden an chromosomalem Material bei beiden Patientengruppen.

Obwohl die grundlegenden Bedingungen beider Patientengruppen bis auf die Amifostingabe gleich waren, zeigte sich eine große interindividuelle Variation der chromosomalen Residualschäden in beiden Gruppen. Dieser interindividuelle Unterschied der chromosomalen Schäden ist bereits bei anderen Tumorpatienten beschrieben worden (Huber et al., 1999, Dikomey et al., 1998, Kiltie et al., 1999, Müller et al., 2001). Die individuelle Sensibilität der einzelnen Patienten auf Bestrahlung und Chemotherapie erscheint bedeutender

zu sein, als das Alter der Patienten, der Zeitraum nach einer Radiochemotherapie oder das Radioprotektivum Amifostin.

Wäre ein protektiver Effekt auf chromosomaler Ebene nachzuweisen gewesen, hätten die Chromosomen der mit Amifostin behandelten Patienten signifikant weniger Schäden aufweisen müssen als die Chromosomen in der unbehandelten Kontrollgruppe. Dies hätte gleichzeitig die schwierige Frage aufkommen lassen, ob damit die therapeutische Wirksamkeit der Radiochemotherapie unter Amifostingabe beeinträchtigt wird. Denn wenn Amifostin nach Radiochemotherapie zu weniger DNA-Schäden führt, so könnte dies bedeuten, dass Amifostin die gewünschte radiochemotherapeutische Wirkung auf die abzutötenden Tumorzellen abschwächt.

Wäre es in der mit Amifostin behandelten Patientengruppe zu einem deutlichen Anstieg der Aberrationshäufigkeit gekommen, hätte es daran liegen können, dass unter Amifostingabe Zellen überleben, die normalerweise der Apoptose unterliegen. Eine Reduzierung des apoptotischen Zelltods nach Radiochemotherapie unter Amifostingabe ist bei Provinciali et al. (1999) und Bisht et al. (2000) beschrieben.

4.3.1 Häufigkeit der chromosomalen Brüche in dieser Studie

Die beiden unterschiedlichen Gruppen zeigten im Durchschnitt 0,65 Brüche pro Mitose (B/M) mit und 0,76 B/M ohne Amifostin (siehe **Abb. 3.50, 3.51, Tab. 15**), was beides signifikant erhöht ist, wenn man es mit nicht bestrahlten Kontrollen vergleicht, die eine durchschnittliche Bruchwahrscheinlichkeit von 0,00 – 0,05 B/M aufweisen (Kuechler et al., 2002). Hassold et al. (1996) beschreiben die durchschnittliche Häufigkeit von Chromosomenaberrationen bei gesunden unbestrahlten Personen mit 0,6 %.

Zum Zeitpunkt dieser Studie zeigten beide Gruppen durchschnittlich eine ähnliche Anzahl an aberranten Zellen (22,1% mit Amifostin versus 24,4% ohne

Amifostin). Es gab keine signifikanten Unterschiede ($p= 0,619$). Auch der Vergleich der Anzahl der Brüche zwischen den beiden Gruppen insgesamt, erbrachte keine signifikanten Unterschiede ($p= 0,755$).

Nach einer Radiochemotherapie, aber auch nach einer aggressiven Kultivierung von Lymphozyten, kommt es immer zu chromosomalen Schäden, die sofort auftreten und wieder verschwinden, und zu solchen, die bestehen bleiben (siehe zusammenfassende Darstellung bei Bauchinger et al., 2001). Besonders die azentrischen chromosomalen Fragmente lassen sich nur verhältnismäßig kurz nachweisen, und geben damit einen Hinweis auf akut eingetretene chromosomale Schäden (siehe zusammenfassende Darstellung bei Bauchinger et al., 2001). Da es in beiden Patientengruppen nicht zu einer Erhöhung von azentrischen Chromosomenfragmenten kam, kann davon ausgegangen werden, dass die gefundenen chromosomalen Schäden auf die vor 2 bis 3 Jahren stattgefundene Radiochemotherapie zurückzuführen sind.

In dieser Studie ergeben sich keine Hinweise auf eine spezielle Anhäufung einer bestimmten Aberrationsform (siehe **Abb. 3.1 – 3.49**) in einer der beiden Gruppen.

In beiden Patientengruppen war die Verteilung der unterschiedlichen chromosomalen Aberrationen ähnlich. Bedingt auffällig war bei fast allen Aberrationsformen, dass die Bruchhäufigkeit in der ohne Amifostin behandelten Patientengruppe leicht erhöht war, gegenüber der mit Amifostin behandelten. Bei $n = 12$ kann daraus allerdings kein signifikanter Unterschied abgeleitet werden.

4.3.2 Einfache Doppelstrangbrüche

Doppelstrangbrüche (DSB) entstehen unter anderem durch Interaktion mit Hydroxyl- und Sauerstoffradikalen, die z. B. nach einer Radiochemotherapie

auftreten können. Der Zelltod nach Bestrahlung findet meist erst nach mehreren Zellteilungen statt (siehe zusammenfassende Darstellung bei Schmitt, 1998).

Bei der Patientengruppe, die mit Amifostin behandelt wurde, fand sich eine leicht erniedrigte Anzahl an Doppelstrangbrüchen (**Abb. 3.9, 3.25**) gegenüber der ohne Amifostin behandelten Gruppe. Mittelwert (MW)= 7 +/-1,3 DSB pro 100 Metaphasen versus MW= 8,8 +/-2,7 DSB. Da die Anzahl der untersuchten Patienten so gering ist (n = 12) kann nur ein Trend, nicht aber eine protektive Wirkung des Amifostins beschrieben werden.

4.3.3 Reziproke Translokationen

Die Häufigkeit der reziproken Translokationen lag bei durchschnittlich 10,9 +/-1,8 pro 100 Metaphasen in der Amifostingruppe und bei 12,4 +/-4,1 in der Vergleichsgruppe.

Reziproke Translokationen liegen bei Neugeborenen etwa bei 1:700 Zellen vor (zusammenfassende Darstellung bei Körner und Witkowski, 1997).

Die Aberrationshäufigkeit dieses speziellen Translokationstypes zeigte in dieser Studie eine 70 – 80 fache Erhöhung. Insgesamt allerdings eine ähnliche Verteilung und Vielfalt in beiden Gruppen mit einer leichten Erniedrigung der Bruchhäufigkeit in der mit Amifostin behandelten Patientengruppe (siehe **Abb. 3.1, 3.8, 3.13, 3.29**).

Die Anzahl der stabilen Aberrationen verändert sich nach 48 oder 72 stündiger Kultivierung nicht, bzw. kaum (Schmidberger et al., 2001). Die stabilen Aberrationen haben von den chromosomalen Aberrationen die größte klinische Relevanz, weil sie eine Rolle in der Entstehung von sekundären Neoplasien, bzw. Strahlen- induzierter Leukämie spielen können (Gershkevitsh et al., 2002 und Kleinerman et al., 1989). Deshalb wurde ein separater Vergleich der reziproken Translokationen aller 12 Patienten durchgeführt.

4.3.4 Einfache Translokationen

Im Vergleich zu gesunden, unbestrahlten Patienten fiel auch bei dieser Aberrationsform eine deutliche Häufung (**Abb. 3.7, 3.27, 3.32**) auf. In der mit Amifostin behandelten Patientengruppe kam es im Durchschnitt zu 8,1 \pm 1,5 Translokationen in 100 untersuchten Metaphasen (MP). Eine sehr ähnliche Verteilung von einfachen Translokationen mit minimaler Erhöhung ließ sich in der ohne Amifostin behandelten Kontrollgruppe darstellen, 8,4 \pm 1,8 Translokationen pro 100 MP.

4.3.5 Inversionen und Ringchromosomen

Auch diese chromosomalen Aberrationsformen ließen sich in dieser Studie darstellen (siehe **Abb. 3.15, 3.16, 3.41** und **3.3, 3.21**). Durchschnittlich kam es in der mit Amifostin behandelten Gruppe doppelt so häufig (1,6 \pm 0,4 pro 100 MP) zu einem Ringchromosom oder einer Inversion wie in der unbehandelten Gruppe (0,8 \pm 0,4 pro 100 MP). Ob dies zufällig der Fall war, oder ob das Amifostin einen Einfluß auf diese chromosomale Aberrationsform hat, kann in dieser Studie nicht beantwortet werden. Dazu sind die Häufigkeiten dieser Aberrationsformen bei dieser Untersuchung zu selten (0 – 3 Ereignisse pro 100 MP). Des Weiteren wurden zu wenig verschiedene Patienten untersucht.

4.3.6 Dizentrische Chromosomen

In dieser Studie wurde auch eine erhöhte Anzahl von dizentrischen Chromosomen gefunden (**Abb. 3.1, 3.5, 3.14, 3.37, 3.38**). Im Mittel fanden sich 3,6 \pm 1,3 dizentrische Chromosomen in 100 Metaphasen in der Amifostingruppe. In der ohne Amifostin behandelten Patientengruppe waren es im Durchschnitt 4,0 \pm 1,5 pro 100 MP. Diese Zahlen demonstrieren wieder eine leichte Erhöhung der Bruchhäufigkeit im ohne Amifostin behandelten Patientenkollektiv.

4.3.7 Komplexe Rearrangements

Die komplexen chromosomalen Rearrangements (CCR) wurden genau analysiert (**Abb. 3.6, 3.12, 3.17**), da sie auf eine Hypersensibilität des Patienten gegenüber ionisierender Strahlung hinweisen können (Dunst et al., 1995 und Neubauer et al., 1997).

Es gab aber bei keinem Patienten auffällig viele CCR, so dass insgesamt davon ausgegangen wurde, dass kein Patient eine Hypersensibilität gegenüber ionisierender Strahlung aufgewiesen hat. Dies deckt sich mit den klinischen Daten, da auch keine Überreaktionen bei den Patienten beobachtet wurden.

In der mit Amifostin behandelten Patientengruppe gab es durchschnittlich 2,6 +/- 0,9 CCR pro 100 MP versus der unbehandelten Gruppe, in der 4,2 +/- 1,4 CCR in 100 MP auftraten.

Passend zu dem oben beschriebenen Trend, liegt auch hier wieder eine minimale Erhöhung der Bruchhäufigkeit in der ohne Amifostin behandelten Gruppe vor.

4.3.8 Klonale Veränderungen

Die Beteiligung des Knochenmarks im Bestrahlungsfeld muss beachtet werden, da die Exposition einer Strahlendosis auf das Knochenmark klonale Aberrationen hervorrufen kann. Diese können dann die Ursache dafür sein, dass im peripheren Blut vermehrt Zellen mit identischen stabilen Aberrationen gefunden werden (siehe zusammenfassende Darstellung bei Seyffert et al., 2003). Dies ist aber in keiner der beiden hier untersuchten Gruppen der Fall, es konnten keine klonalen Veränderungen festgestellt werden.

4.3.9 Numerische Chromosomenaberrationen

Durch die 24-Farben-FISH Methode konnten neben den strukturellen auch die numerischen Chromosomenaberrationen, die nach Radiochemotherapie auftreten, sehr gut dargestellt werden (**Abb. 3.2, 3.10, 3.36**).

Als eine zusätzliche Aberrationsform nach *in vivo* Bestrahlung konnten die mitotischen Non-disjunctions von Chromosomen (Küchler et al., 2001) postuliert werden (siehe **Abb. 3.19**). Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Ponsa et al., 2001.

4.4 Literatur

Ein protektiver Effekt des Amifostins gegen chromosomale Schäden nach Radiochemotherapie wurde durch Devi et al. (1998) beschrieben. An aus Knochenmark gewonnenen Chromosomen untersuchten sie die akute Reaktion nach Ganzkörperbestrahlung bei adulten Mäusen. Dieser Versuch lief unter streng definierten Bedingungen, die nur im Tiermodell erreicht werden können. Das Ausmaß an Residualschäden blieb in der Studie von Devi et al. (1998) offen. Da sich die hier vorliegende Studie direkt auf die Residualschäden bezieht und „nur“ eine Partialbestrahlung des Patienten bei maximaler Knochenmarkprotektion durchgeführt wurde, haben beide Studien unterschiedliche Bedingungen und können nicht direkt miteinander verglichen werden.

Da Amifostin nicht selber mutagen wirkt (Kataoka et al., 1996) wurde davon ausgegangen, dass alle chromosomalen Schäden durch die Radiochemotherapie verursacht wurden.

Einige Studien zeigten, dass Amifostin den durch Chemotherapie (Provinciali et al., 1999) oder Radiochemotherapie (Bisht et al., 2000) induzierten apoptotischen Zelltod verhindert. Doch der genaue Wirkmechanismus, wie das Amifostin den programmierten Zelltod verhindert, ist noch nicht bekannt. Es könnte also auch die Möglichkeit bestehen, dass in der mit Amifostin behandelten Patientengruppe die Anzahl der Residualschäden größer ist, da sich die vor der Apoptose beschützten Zellen anhäufen, die sonst nicht überlebt hätten. Das würde zu Zellen führen, die nicht wieder in die Mitosephase eintreten können. Um herauszufinden, in welchem Stadium des Zellzyklus die

betroffenen Zellen stehen bleiben, könnten Studien mit der Technik durchgeführt werden, die bei Lemke et al. (2002) beschrieben ist. Studien dieser Art sollten frühzeitig nach einer Radiochemotherapie mit Amifostin-Behandlung angesetzt werden.

Amifostin wurde nur in der 1. und 5. Woche der Radiotherapie verabreicht, während der Chemotherapie mit 5-FU. Vielleicht hätte es eine deutlichere protektive Wirkung im Bezug zu den unbehandelten Patienten gegeben, wenn Amifostin an jedem Tag direkt vor der Bestrahlung appliziert worden wäre. Eventuell müsste auch insgesamt eine höhere Dosis Amifostin verabreicht werden, um einen protektiven Effekt erzielen zu können. Einige Studien lassen einen myeloprotektiven Effekt des Amifostins möglich erscheinen (Ethyol, Essex Pharma, 1998, Brizel et al., 2000, Hensley et al., 1999).

4.5 Schlussfolgerung und Zukunftsaussichten

Während eine signifikante klinisch feststellbare Abschwächung der Normalgewebstoxizität in der Patientengruppe mit Amifostin zu beobachten war (Dunst et al., 2000), zeigte der Vergleich hinsichtlich der chromosomalen Residualschäden 2–3 Jahre nach Abschluss der Radiochemotherapie eine hohe interindividuelle Variabilität zwischen den einzelnen Patienten. Ein statistisch nachweisbarer Unterschied zwischen der mit und der ohne Amifostin behandelten Patientengruppe konnte nicht dargestellt werden.

Neu beschrieben wurden in dieser Studie mitotische Non-disjunctions nach *in vivo* Radiochemotherapie und Amifostin-Behandlung, die etwa zeitgleich mit Ponsa et al. (2001) bei Kuechler et al. (2001) publiziert wurden. Des Weiteren kam es zu den bekannten chromosomalen Aberrationen.

Somit kann angenommen werden, dass die protektive Wirkung des Amifostins auf klinischer Ebene nicht von einer protektiven Wirkung auf genetischer Ebene überlagert wird.

Diskussion

Eine wirklich statistisch abgesicherte Aussage über die Radiochemoprotektion des Amifostin auf chromosomaler bzw. genetischer Ebene kann nur erfolgen, wenn Studien durchgeführt würden, die ähnlich wie diese aufgebaut sind. Die Anzahl der teilnehmenden Patienten müsste stark erhöht werden, um eine Randomisierung gewährleisten zu können. Gleichzeitig müssten die chromosomalen Aberrationen intermittierend untersucht werden, z. B. wieder mit der 24-Farben-FISH Methode.

Eine Untersuchung vor der Radiochemotherapie, um mögliche, schon vorher bestehende, Mutationen abklären zu können. Kurz nach der Therapie, um die aktuellen Schäden der peripheren Lymphozyten festzustellen und nach einem längerem Zeitraum, um die Schäden der Stammzellen des hämatopoetischen Systems beschreiben zu können.

Da diese Studie nur 12 Patienten einschließt, und die interindividuelle Sensibilität der Strahlenempfindlichkeit einen großen Einfluss zu haben scheint, kann es durchaus sein, dass ein protektiver oder modulierender Effekt des Amifostins maskiert wurde. Vielleicht unterliegt die Wirkung des Amifostins aber auch komplexeren Mechanismen, die auf zytogenetischer Ebene nicht darstellbar sind.

Hier sind weiterführende, auf diese Pilotstudie aufbauende Untersuchungen notwendig.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Rolle des Radioprotektivums Amifostin auf chromosomaler Ebene untersucht. In Zusammenarbeit mit der Martin–Luther–Universität in Halle–Wittenberg wurden 30 Rektumkarzinompatienten postoperativ einer Radiochemotherapie unterzogen. Neben der herkömmlichen Radiochemotherapie wurde 15 Patienten zusätzlich an den Tagen der Chemotherapie vor der Bestrahlung Amifostin (500 mg/d) intravenös appliziert. Im Institut für Humangenetik und Anthropologie in Jena wurden ca. zwei Jahre später in einem Blindversuch von 12 dieser Patienten, aus peripherem Blut gewonnene Metaphasechromosomen mittels 24–Farben–Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung untersucht. Je 100 Mitosen eines jeden Patienten wurden hinsichtlich chromosomaler Residualschäden ausgewertet. Dabei stellte sich heraus, dass bei allen 12 untersuchten Patienten deutliche Schäden auf chromosomaler Ebene zu erkennen waren. Es konnten einfache und reziproke Translokationen, Ringchromosomen, azentrische und dizentrische Chromosomen sowie Insertionen und komplexe chromosomale Rearrangements dargestellt werden. Gleichzeitig konnte eine neue Aberrationsform nach *in vivo* Bestrahlung postuliert werden, und zwar mitotische Non–disjunctions, die mit einem Zugewinn an chromosomalem Material innerhalb der Zelle verbunden waren.

Die Auswertung der durchschnittlichen Anzahl von Brüchen pro Mitose (B/M) zeigte einen erhöhten Anteil chromosomaler Residualschäden, sowohl in der mit Amifostin (0,65 B/M [Range 0,32–0,97]) als auch in der ohne Amifostin behandelten Patientengruppe (0,76 B/M [Range 0,31–1,25]). Auch der durchschnittliche Anteil von Zellen, die Aberrationen enthielten, war etwa gleich. 22,1 (Range 13–32) mit Amifostin versus 24,4 (Range 13–35) ohne Amifostin. Ein statistisch abgesicherter protektiver Effekt des Amifostins auf chromosomaler Ebene konnte nicht dargestellt werden. Die protektive Wirkung des Amifostins auf klinischer Ebene überlagert sich somit nicht erkennbar mit der gewünschten destruirenden Wirkung der Radiochemotherapie auf genetischer bzw. chromosomaler Ebene.

Literaturverzeichnis

Publikationen der Studie

Kuechler A, Wendt T, Dreidax M, Claussen U, Liehr T, Pigorsch S, Dunst J (2001)

24-Farben-FISH-Nachweis von mitotischen Non-disjunctions bei der Untersuchung chromosomaler Residualschäden nach kombinierter Radiochemotherapie.
Strahlentherapie Onkologie 2001; 177: 104, P 10.3

Kuechler A, Dreidax M, Pigorsch S, Dunst J, Claussen U, Liehr T, Wendt T (2001)

Mitotic non-disjunction as residual chromosomal damage in human lymphocytes after radiochemotherapy detected by 24-colour-FISH.
Chromosome Research 2001; 9: 152, P 178

Kuechler A, Dreidax M, Pigorsch SU, Dunst J, Claussen U, Liehr T, Wendt TG (2002)

Residual chromosomal damage after radiochemotherapy with and without use of additional amifostine analyzed by 24-color-FISH.
Mol Rad Biol Oncol 2002, Vol. 3, p 38, Abstractnr Pl.6.

Kuechler A, Dreidax M, Pigorsch S, Liehr T, Claussen U, Wendt T, Dunst J (2003)

Residual chromosomal damage after radiochemotherapy with and without amifostine detected by 24-Farben FISH.
Strahlentherapie Onkologie 2003 Juli; 179 (7): 493–8

Verwendete Quellen

Auletta JJ, Shurin S (1999)

Improved hematopoiesis using amifostine in secondary myelodysplasia.
J Pediatr. Hematol. Oncol; 21: 531–534

Bauchinger M (1998)

Retrospective dose reconstruction of human radiation exposure by FISH/chromosome painting.
Mutat. Res; 404: 89–96

Bauchinger M, Salassidis K, Braselmann H, Vozilova A, Pressl S, Stephan G, Snigiryova G, Kozheurov VP, Akleyev A (1998)

FISH-based Analysis of stable translocations in a Techa River population.
Int J Radiat Biol; 73: 605–12.

Bauchinger M, Schmid E, Braselmann H (2001)

Time-course of translocation and dicentric frequencies in a radiation accident case.
Int J Radiat Biol; 77: 553–7

Bisht KS, Prabhu S, Devi PU (2000)

Modification of radiation induced damage in mouse intestine by WR-2721.
Indian J Exp Bio;38: 669–74

Brizel DM, Wassermann TH, Henke M, Strnad V, Rudat V, Monnier A, Eschwege F, Zhang J, Russell L, Oster W, Sauer R (2000)

Phase III Randomized Trial of Amifostine as a Radioprotector in Head and Neck Cancer.
Journal of Clinical Oncology; 18: 3339–3345

Buchta, Höper, Sönnichsen (2002)

Das zweite STEX.
Springer Verlag, 1.Auflage

Bühling, Lepenies, Witt (1995)

Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie.
Urban & Schwarzenberg 1.Auflage

Buntzel J, Kuttner K, Frohlich D, Glatzel M (1998)

Selective cytoprotection with amifostine in concurrent radiochemotherapy for head and neck cancer.
Ann Onco1 ;9: 505–9

Devi PU, Bisht K, Vinitha M (1998)

A comparative study of radioprotection by Ocimum flavonoids and synthetic aminothiols protectors in the mouse.
BrJ Radio; 71: 782–4

Dikomey E, Dahm-Daphi J, Brammer I, Martensen R, Kaina B (1998)

Correlation between cellular radio sensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines.
Int J Radiat Biol; 73 (3): 269-278

Dunst J, Gebhart E, und Neubauer S (1995)

Can an extremely elevated radiosensitivity in patients be recognized by the in-vitro testing of lymphocytes?
Strahlentherapie Onkologie; 171: 581–586

Dunst J, Semlin S, Pigorsch S, Müller AC und Reese T (2000)

Intermittent use of Amifostine during postoperative Radiochemotherapy and acute Toxicity in Rectal Cancer Patients.
Strahlentherapie Onkologie; 176: 416–421

Ebbeler RFW (2004)

Induktion und Reparatur Strahlen-induzierter DNA-Schäden in Lymphozyten von Brustkrebspatientinnen: Korrelation mit akuten Hautreaktionen nach Radiotherapie
Dissertation, Dr.med, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Brsg.

Ethyol, Essex Pharma GmbH (1998)

Wissenschaftliche Basisbroschüre

Fiorio R, Vellosi R und Bronzetti G (1994)

Effects of spermine on formation of HGPRT–mutants induced by ethylmethanesulfonate, methylmethanesulfonate, and mitomycin C in V79 Chinese hamster cells.
Enviromental Molecular Mutagenesis; 23: 294–298

Gall JG, Pardue NLL (1969)

Formation and detection of RNA–DNA hybrid molecules in cytological preparation.
Genetics; 63: 378–383

Gebhart E, Neubauer S, Schmitt G, Birkenhake S, Dunst J (1996)

Use of a three–Color chromosome in situ suppression technique for the detection past of radiation exposure.
Radiat Res; 145: 47–52

Gershkevitch E, Hildebrandt G, Wolf U, Kamprad F, Realo E, Trott KR (2002)

Chromosomal aberration in peripheral lymphocytes and doses to the active bone marrow in radiotherapy of prostate cancer.
Strahlentherapie Onkol; 178: 36–42

Grdina DJ und Nagy B (1986)

The effect of 2-((aminopropyl)amino)ethanethiol (WR-1065) on radiation-induced DNA damage and repair and cell progression in V79 cells.

Br. J. Cancer; 54: 933-941

Hassold, T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J, Zaragoza M (1996)

Human aneuploidy: Incidence, origin, and etiology.

Environ. Mol. Mutagen. 28: 167-175 (1996)

Hensley ML, Schuchter LM, Lindley C, Meropol NJ, Cohen GI, Broder G, Gradishar WJ, Green DM, Langdon RJ Jr, Mitchell RB, Negrin R, Szatrowski TP, Thigpen JT, Von Hoff D, Wasserman TH, Winer EP, Pfister DG (1999)

Clinical practice guidelines for the use of Chemotherapy and Radiotherapy protectans.

Journal of Clinical Oncology; 17: 3333-3355

Heinze B, Arnold R, Rutzen-Loesevitz, Fliedner TM (1995)

The role of stable chromosome aberrations as biological indicators of radiation effect: Studies in patients after total body irradiation and bone marrow transplantation.

Stem Cells; 13: 191-198

Heller A (2003)

Genetische Charakterisierung chromosomaler Bruchpunkte.

Dissertation, Dr.rer.nat, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Huber R, Braselmann H, Kulka U, Schumacher-Georgiadou V, Bayerl A, Molls M, Bauchinger M (1999)

Follow-up analysis of translocation and dicentric frequencies, measured by FISH-chromosome painting in breast cancer patients after partial-body radiotherapy with little bone marrow exposure.

Mutat Res; 446: 103-9

John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969)

RNA-DNA hybrids at the cytological level.

Nature; 223: 582-587

Kaiser P (1984)

Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics.

Human Genet; 68(1):1-47

Kataoka Y, Perrin J, Hunter N, Milas L, Grdina DJ (1996)

Antimutagenic effects of amifostine: clinical implications.

Semin. Oncol; 23: 53-57

Kiltie AE, Ryan AJ, Swindell R, Barber JB, West CM, Magee B, Hendry JH (1999)

A correlation between residual radiation-induced DNA double-strand breaks in cultured fibroblasts and late radiotherapy reactions in breast cancer patients.

Radiother Oncol; 51 (1): 55-65

Kleinerman RA, Littfield LG, Tarone RE, Machado SG, Blettner M, Peters LJ, Boice JD Jr. (1989)

Chromosome aberrations in peripheral lymphocytes and radiation dose to active bone marrow in patients treated for cancer of the cervix.

Radiat Res; 119: 176-90

Koehler MR, Steinlein C, Sckröck E, Yu V, Nanni M, Schmid M, Venkitaraman A, Calabrese G, Palka G, Bar-Am I und Garini (1999)

Spectral Biolmaging in modern cytogenetics and pathology.
European Cytogeneticists Association Newsletter; 4: 3–8

Körner H Dr. und Prof. Dr. R Witkowski (1997)

Humangenetik Systematisch.
Uni-med, 1. Auflage

Kuechler A, Dreidax M, Pigosch S, Dunst J, Claussen U, Liehr T, Wendt T (2001)

Mitotic non-disjunction as residual chromosomal damage in human lymphocytes after radiochemotherapy detected by 24-colour-FISH.
Chromosome Research 2001; 9: 152, P 178

Kuechler A, Neubauer S, Grabenbauer GG, Claussen U, Liehr T, Sauer R, Wendt TG (2002)

Is 24-color FISH detection of in-vitro radiation-induced chromosomal aberrations suited to determine individual intrinsic radiosensitivity?
Strahlenther Onkol; 178: 209–15

Kuechler A, Dreidax M, Pigosch S, Liehr T, Claussen U, Wendt T, Dunst J (2003)

Residual chromosomal damage after radiochemotherapy with and without amifostine detected by 24-color FISH.
Strahlentherapie Onkologie 2003 Juli; 179 (7): 493–8

Lemke J, Claussen J, Michel S, Chudoba I, Muhlig P, Westermann M, Sperling K, Rubtsov N, Grummt UW, Ullmann P, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T, Claussen U (2002)

The DNA-based structure of human chromosome 5 in interphase.
Am J Hum Genet; 71: 1051–9

Lichter P (1997)

Multicolor FISHing: what's the catch?
TIG; 13: 475–478

List AF, Heaton R, Glinsmann-Gibson B, Capizzi RL (1998)

Amifostine stimulates formation of multipotent and erythroid bone marrow progenitors.
Leukemia; 12: 1596–602

Mack MG, Balzer JO, Vogl T (2002)

Kongressbericht: Innovative Diagnostik und Therapie des kolorektalen Karzinoms.
Deutsches Ärzteblatt 99, Ausgabe 13 vom 29.03.2002, Seite A-866 / B-718 / C-672

Mitelman F (1995)

An international System for Human Cytogenetic Nomenclature.
ISCN(1995) S. Karger, Basel

Müller WU, Bauch T, Stüben G, Sack H, Streffer C (2001)

Radiation sensitivity of lymphocytes from healthy individuals and cancer patients as measured by the comet assay.
Radiat Environ Biophys; 40 (1): 83-89

Niedermayer I, Steilen-Gimpel H, Henn W, Kolles H (1998)

Meningeome–Neue Erkenntnisse zur Tumorpheriferation.
Magazin Forschung; 1: 49–53

Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, Viegant J, Hopman AH, Tanke HJ, Raap AK (1989)

Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences.

Cytometry; 10: 20–27

Neubauer S, Dunst J, Gebhart E (1997)

The impact of complex chromosomal rearrangements on the detection of radiosensitivity in cancer patients.

Radiother Oncol; 43: 189–195

Passarge E (2003)

Taschenatlas der Genetik.

Thieme Verlag, 2. Auflage

Provinciali M, Ciavattini A, Di Stefano G, Argentati K, Garzetti GG (1999)

In vivo amifostine (WR-2721) prevents chemotherapy-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes from cancer patients.

Life Sci; 64: 1525–32

Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986)

Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridisation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 83: 2934–2938

Ponsa I, Barquinero JF, Miro R, Egozcue J, Genesca A (2001)

Non-disjunction and chromosome loss in gamma-irradiated human lymphocytes: a fluorescence in situ hybridisation analysis using centromere-specific probes.

Radiat. Research; 155: 424–431

Rieth A, Schuth J, Kudielka (1996)

Cytoprotection in Chemo- and Radiotherapy with Amifostine: A new strategy in Oncology.

Onkologie; 19:315-320

Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P (1977)

Labeling deoxyribonucleic acid to high activity in polymerase I.

J. Mol. Biol; 133: 237–241

Rosen EM, Fan S, Rockwell S, Goldberg ID (1999)

The molecular and cellular basis of radio sensitivity: implications for understanding how normal tissue and tumors respond to therapeutic radiation.

Cancer Invest; 17 (1): 56-72

Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1986)

Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-Dqalpha DNA with allelespecific oligonucleotide.

Nature; 324: 163–16

Saracoglu K, Brown J, Kearney L, Uhrig S, Azofeifa J, Fauth C, Speicher MR, Eils R (2001)

New concepts to improve resolution and sensitivity of molecular cytogenetic diagnostics by multicolor fluorescence *in situ* hybridisation.

Cytometry; 44: 7–15

Savage JRK, Simpson PJ (1994) a)

On scoring of FTSH "painted" chromosome exchange aberrations.

Mutat Res; 307: 345–53

Savage JRK, Simpson PJ. (1994) b)

FISH "painting" pattern resulting from complex exchanges.
Mutat Res; 312: 51–60

Schmidberger H, Virsik-Koepp P, Rave-Fränk M, Reinosch KR, Pradier O, Munzel U, Hess CF (2001)

Reciprocal translocations in patients with testicular Seminoma before and after radiotherapy.
Intern. Journal of Radiation Oncology Biol. Phys; 50: 857–864

Schmidt RF, Thews G (1997)

Physiologie des Menschen.
Springer Verlag, 27.Auflage

Schmitt Gerd Prof. Dr. (1998)

Onkologie systematisch.
1.Auflage Unimed

Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996)

Multicolor spectrat karyotyping of human chromosomes.
Science; 273: 4947

Senger G, Chudoba I, Plesch A (1998)

Multicolor-FISH Die Erkennung von Chromosomenveränderungen über 24 Farben.
Bioforum; 9: 499–503

Seyffert W, Balling R, Bunse A, de Couet HG (2003)

Lehrbuch der Genetik.
Spektrum Akademischer Verlag 2. Auflage

Siegenthaler W (2000)

Klinische Pathophysiologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 7.Auflage

Smoluk GD, Fahey RC, Calabro-Jones PM, Aguilera JA, Ward JF (1988)

Radioprotection of cells in culture by WR-2721 and derivatives: form of the drug responsible for protection.
Cancer Research; 48: 364–3647

Spath-Schwalbe E, Lange C, Genvresse I, Kruger L, Eucker J, Schweigert M, Sezer O, Budach V, Possinger K (2002)

Influence of amifostine on toxicity of CHOP in elderly patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma – a phase II study.
Anticancer Drugs; 13: 395–403

Speicher MR, Gwyn B, Ward DC (1996)

Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH.
Nat Genet; 12: 368–75

Speicher MR, Ward CD (1996)

The coloring of cytogenetics.
Nature medicine; 2: 1046–1048

Speicher MR, Eils R (1998)

Multiplex-FISH (M-FISH): Ein neues Verfahren in der zytogenetischen Diagnostik.
Biospektru; 2: 84–86

Spencer CM, Goa KL (1995)

Amifostine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential as a radioprotector and cytotoxic chemoprotector.
Drugs; 50: 1001–31

Strachan T, Read AP (1996)

Molekulare Humangenetik.
Spektrum, Akademischer Verlag, 1. Auflage

Strnad V (2000)

Radioprotektion mit Amifostin.
Medizin im Bild, Sonderdruck 3/2000

Tariverdian G und Buselmaier W (1995)

Chromosomen Gene Mutationen.
Springer Verlag, 1. Auflage

Telenius H, Pelmear AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Behmel A, Ferguson-Smith MA, Nordenskjold M, Pfragner R, Ponder BA (1992)

Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes.
Genes Chromosomes Cancer; 4: 257–263

Trog D, Bank P, Wendt TG, Koscielny S, Beleites E (1999)

Daily amifostine given concomitantly to chemoradiation in head and neck cancer. A pilot study.
Strahlenther Onkol; 175: 444–9

Verdorfer I, Neubauer S, Letzet S, Angerer J, Arutyunyan R, Martus P, Wucherer M, Gebhart E (2001)

Chromosome painting for cytogenetic monitoring of occupationally exposed and non-exposed groups of human individuals.
Mutat Res; 491: 97–109

Verma RS, Babu A (1998)

Human chromosomes – manual of basic techniques. New York – Oxford – Beijing – Frankfurt – Sao Paulo – Sydney – Tokyo – Toronto:
Pergamon Press, 1989

Wasserman T, Mackowiak JI, Brizel DM, Oster W, Zhang J, Peeples PJ, Sauer R (2000)

Effect of amifostine on patient assessed clinical benefit in irradiated head and neck cancer.
Int J Radiat Oncol Biol Phys; 48: 1035–9

Wasserman TH, Brizel DM (2001)

The role of amifostine as a radioprotector [Review].
Oncology (Huntingt); 15: 1349–54, Discussion 1357–60

Wendt TG, Grabenbauer GG, Rödel CM, Thiel HJ, Aydin H, Rohloff R, Wustrow TP, Iro H, Popella C, Schalhorn A (1998)

Simultaneous radiochemotherapy versus radiotherapy alone in advanced head and neck cancer: a randomized multicenter study.
Journal Clinical Oncology; 16: 1318–1324

1. <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/cho-kolk.htm>

Die Leitlinien wissenschaftlicher medizinischer Fachgesellschaften zum Dickdarmkrebs

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei denjenigen bedanken, die mich im Verlauf dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Uwe Claussen möchte ich für die Überlassung des Themas, für die vielen Diskussionsstunden sowie für die stete Unterstützung ganz herzlich danken.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Alma Kuchler, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und sich immer wieder Zeit für mich und diese Arbeit genommen hat, auch wenn wir räumlich weit getrennt waren.

Vielen Dank auch an die Hallenser Kollegen Prof. Dr. Jürgen Dunst und v.a. Frau Dr. Pigorsch, ohne deren Vorarbeit diese Studie gar nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Peter Kaiser möchte ich sehr danken für die spontane Annahme der Arbeit, seine zügigen Korrekturen und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Meinen Eltern Franz Dreidax und Margot Faber danke ich für all ihre Mühe und ihre Unterstützung während meines Studiums.

Und ganz besonders danke ich meinem Mann Jan Claussen, der mir immer tatkräftig und liebevoll zur Seite steht.

Lebenslauf

Name: Mareike Franziska Claussen, geb. Dreidax
Geburtsdatum: 19.07.1977
Geburtsort: Wilhelmshaven
Familienstand: verheiratet, eine Tochter, einen Sohn

Schulbildung:

1984 – 1988 Grundschohle Sande
1988 – 1990 Orientierungsstufe Sande
1990 – 1997 Gymnasium Cäciliensohlo Wilhelmshaven
07/1997 Abitur

Studium:

9/1997 – 8/1999 Biologiestudium
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
7/1999 Vordiplom, Biologie
9/1999 – 8/2003 Medizinstudium, Friedrich-Schiller Universität in Jena
8/2001 Physikum, Medizin
8/2002 Erstes Staatsexamen, Medizin
9/2000 – 8/2003 Biologie Hauptstudium
Friedrich-Schiller Universität Jena
9/2002 – 6/2003 Diplomarbeit Biologie, Department of Plant Sciences,
University of Oxford, GB
7/2003 Abschluss des Biologiestudiums, Note: 1,1
8/2003 – 9/2005 Medizinstudium an der Universität Ulm
9/2005 Zweites Staatsexamen, Medizin
9/2005 – 11/2006 Medizinstudium an der Universität Tübingen
11/2006 Drittes Staatsexamen, Medizin
16/11/2006 Abschluss des Medizinstudiums, Gesamtnote: 2,1

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Chromosomale Residualschäden nach Radiochemotherapie mit und ohne Gabe von Amifostin

selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit einer Geldstrafe bestraft wird.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

1. Prof. Dr. Uwe Claussen, Institut für Humangenetik, Universität Jena
2. Dr. Alma Küchler, Institut für Humangenetik, Universität Jena
3. Prof. Dr. Peter Kaiser, Institut für Humangenetik, Universität Tübingen

Die vorgelegte Dissertation wurde von mir am Institut für Humangenetik in Jena angefertigt. Da ich mein Medizinstudium aber in Tübingen abgeschlossen habe, hier wohne und da Prof. Dr. Uwe Claussen mittlerweile mein Schwiegervater geworden ist, ziehe ich es vor, die Dissertation nicht in Jena, sondern in Tübingen einzureichen.

Die vorgelegte Dissertation wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Mit der Arbeit wurde weder ein akademischer Grad erworben noch eine staatliche Prüfung absolviert.

Den Grad eines Dr. med. habe ich noch nicht erworben.

Mir ist bekannt, dass falsche oder unvollständige Angaben zur Folge haben können, dass die Fakultät ein Verfahren zur Entziehung eines eventuell verliehenen akademischen Titels einleitet.

Tübingen, 19.02.2007

Dipl. Biol. Mareike F. Claussen

Abstract

Hintergrund: Amifostin ist eine radioprotektiv wirkende Substanz, die zur Verringerung der akuten Nebenwirkungen bei konventionell fraktionierter Radiotherapie angewandt wird. In der vorliegenden Studie wurde Amifostin bei Patienten eingesetzt, die wegen eines Rektumkarzinoms eine postoperative Radiochemotherapie erhielten. Es wurde bereits beschrieben, dass diese Patienten nach zusätzlicher Amifostingabe eine geringere Akuttoxizität an Haut und Darm zeigten. Nun sollte festgestellt werden, ob die mit Amifostin behandelten Patienten neben einer verringerten klinischen Akutreaktion auch eine geringere Rate an chromosomalen Residualschäden der Lymphozyten aufweisen.

Material und Methoden: Lymphozyten von zwölf Patienten, die wegen eines Rektumkarzinoms vor 2-3 Jahren eine Radiochemotherapie erhalten hatten, wurden mittels 24-Farben-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungstechnik (24-Farben-FISH) auf chromosomale Residualschäden untersucht. Alle Patienten hatten eine Gesamtdosis von 55,8 Gy in Einzeldosen von 1,8 Gy sowie eine Chemotherapie mit 5-Fluorouracil (5-FU) als 120-h-Dauerinfusion (1,000 mg/m² pro Tag) in der 1. und 5. Woche erhalten. Sieben der zwölf Patienten hatten zusätzlich an den Chemotherapie-tagen Amifostin bekommen (Gesamtdosis 500 mg täglich als i.v. Kurzinfusion direkt vor der Bestrahlung). Lymphozytenkultivierung und 24-Farben-FISH erfolgten nach Standardprotokollen. 100 Metaphasen pro Patient wurden auf chromosomale Aberrationen untersucht.

Ergebnisse: Die Auswertung der durchschnittlichen Anzahl von Brüchen pro Mitose (B/M) zeigte einen erhöhten Anteil chromosomaler Residualschäden sowohl in der mit Amifostin (0,65 B/M [0,32-0,97]) als auch in der ohne Amifostin behandelten Patientengruppe (0,76 B/M [0,31-1,25]). Auch der durchschnittliche Anteil von Zellen, die Aberrationen enthielten, war bei 100 ausgewerteten Metaphasen etwa gleich (22,1 [13-32] mit Amifostin vs. 24,4 [13-35] ohne Amifostin). Außerdem zeigten die aufgetretenen Aberrationstypen (einfache Translokationen, reziproke Translokationen, Brüche, dizentrische Chromosomen, Inversionen, Ringchromosomen und komplexe chromosomale Rearrangements) keine statistisch signifikante Häufung in einer der beiden Gruppen.

Schlussfolgerung: Während eine signifikante klinisch feststellbare Abschwächung der Normalgewebstoxizität in der Patientengruppe mit Amifostin zu beobachten war, zeigte der Vergleich hinsichtlich der chromosomalen Residualschäden 2-3 Jahre nach Abschluss der Radiochemotherapie eine hohe interindividuelle Variabilität ohne einen statistisch gesicherten Unterschied zwischen beiden Gruppen.