

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
und Radiologische Onkologie
des Klinikums rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls)

**Experimentelle Untersuchungen zur Volumenänderung und Oxygenierung
muriner Osteosarkome und Mammakarzinome unter Photonen- und
Neutronenstrahlung im Kleinterversuch**

Thomas Freude

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grads eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Molls
2. apl. Prof. Dr. P. E. Kneschaurek

Die Dissertation wurde am 30.01.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.07.2006 angenommen.

Danksagung

- Herrn Prof. Dr. med. M. Molls, Leiter der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und radiologische Onkologie, Klinikum Rechts der Isar, TU-München für die Möglichkeit der Durchführung der Dissertation und für die Bereitstellung seines Instituts und seiner wissenschaftlichen Einrichtungen
- Dem Bayrischen Staatsministerium für Umweltschutz und Landesfragen für finanzielle Unterstützung zur Durchführung des wissenschaftlichen Vorhabens
- Regierung von Oberbayern für Genehmigung der Versuche
- Herrn Dr. med. Thomas Auberger, Oberarzt der Universitätsklinik für Strahlentherapie-Radioonkologie Leopold-Franzens- Universität Innsbruck, für die stete Unterstützung in allen Fragen bezüglich wissenschaftlichen Arbeitens und unermüdlichen Korrekturen der Arbeit
- Frau D. I. Dr. techn. Karin Poljanc, Physikerin am Atominstitut der Österreichischen Universitäten Wien für ihre stetige Unterstützung und im Besonderen für ihre unendliche Geduld bei der Korrektur
- Herren Dr. Lothar Weißfloch, für die Unterstützung bei der Tierbetreuung und die Einführung in die Messmethodik; Frau Prof. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke, für die Überlassung ihres Tierstalls; Herrn Prof. Dr. P. Kneschaurek und Herrn dipl. Physiker R. Wehrmann für ihre Hilfe bei der Dosimetrie; und allen Mitarbeitern des Forschungsreaktors Garching und der Werkstätten der Strahlentherapie Klinikum Rechts der Isar

- Meinen Eltern für die Ermöglichung eines humanmedizinischen Studiums und für die uneingeschränkte Unterstützung während der gesamten Zeit
- Herrn Dr. Karl Friedrich Klein,
Chefarzt der Allgemeinchirurgie des Klinikums Traunstein
für geduldige Unterweisung im Umgang mit dem Computer
- Herrn Felix Freude, meinem Bruder
für technische Unterstützung
- Herrn Bernd Thürrigl,
für sein stetes Engagement bei der Durchführung der Experimente und die nachhaltigen Diskussionen über die Ergebnisse, darüber hinaus für seine uneingeschränkte Freundschaft

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	8
1.1	Stellenwert der malignen Tumoren	8
1.2	Ansatz der Strahlentherapie aus historischer Sicht	8
1.3	Begriff der Strahlenbiologie.....	9
2	PHYSIKALISCHE UND CHEMISCHE GRUNDLAGEN	10
2.1	Direkte und indirekte Wirkung von Strahlung	10
2.2	Relative biologische Wirksamkeit von Strahlung auf Gewebe.....	11
2.2.1	Relative biologische Wirksamkeit unter fraktionierter Strahlung	12
2.2.2	Relative biologische Wirksamkeit in unterschiedlichen Geweben	13
2.3	Der lineare Energietransfer (LET).....	14
2.4	Die Beziehung des RBE zum LET	15
2.5	Der Effekt der Oxygenierung in der Strahlentherapie.....	15
2.5.1	Sauerstoffverstärkungsfaktor	17
2.5.2	Mechanismus des Oxygenierungseffektes in ionisiertem Gewebe	18
2.5.3	Mechanismus der Reoxygenierung in ionisiertem Gewebe	19
2.6	Verhalten und Abhängigkeit der einzelnen Parameter zueinander (RBE, LET, OER)	20
2.7	Problemstellung	21
3	MATERIAL	23
3.1	Versuchstiere und Tumormodelle	23
3.1.1	C3H-Maus und Adenokarzinom AT 17	23
3.1.2	Balb C-Maus und Osteosarkom	23
3.2	Geräte.....	23
3.2.1	Strahlenapplikation am RT 100	23
3.2.2	Strahlenapplikation am Reaktor in Garching	24

3.2.3	Sigma-Eppendorf-pO ₂ -Histogramm/KIMOC	25
3.2.4	Wärmeregulator	27
4	METHODEN	28
4.1	Tierhaltung und Versorgung.....	28
4.2	Narkose und Transplantation	28
4.3	Strahlenapplikation am RT 100.....	29
4.4	Strahlenapplikation am Reaktor/Garching.....	30
4.5	Messanordnung.....	31
4.5.1	Aufbau der Messanordnung	31
4.5.2	Messung des Sauerstoffpartialdrucks im Tumorgewebe	32
4.5.3	Messung des Volumens	35
5	ERGEBNISSE	37
5.1	Osteosarkom	37
5.1.1	Änderung des Volumens im Tumorgewebe.....	37
5.1.2	Änderung des Sauerstoffpartialdrucks im Tumorgewebe	42
5.1.3	Tumolvolumen in Relation zum pO ₂	46
5.1.4	Prozentuale Verschiebung des pO ₂ unter Bestrahlung.....	50
5.2	Mammakarzinom	56
5.2.1	Änderung des Volumens im Tumorgewebe.....	56
5.2.2	Änderung des Sauerstoffpartialdrucks im Tumorgewebe	58
6	DISKUSSION	62
6.1	Einfluss der verwendeten Strahlung auf die Wachstumsverzögerung bei xenotransplantierten Osteosarkomen und AT-17-Adenokarzinomen	62
6.2	Einfluss der verwendeten Strahlung auf die Oxygenierung bei xenotransplantierten Osteosarkomen und AT-17-Adenokarzinomen	63
6.2.1	Wertigkeit der erhobene pO ₂ -Werte unter Berücksichtigung von äußeren Störfaktoren	63
6.2.2	Einfluss von fraktionierter Niedrig-LET- und Hoch-LET-Strahlung auf den Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe.....	65

6.2.3	Prozentuale Verschiebung des Sauerstoffpartialdrucks im Tumorgewebe unter fraktionierter Niedrig-LET- und Hoch-LET-Strahlung.....	67
6.2.4	Relation des Tumolvolumens zum Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe ohne und mit Bestrahlung	68
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	72
8	LITERATURVERZEICHNIS	74

Verzeichnis der Abkürzungen

chir.	chirurgisch
dE	übertragene Energie
dl	durchquerte Länge
DNA	Desoxiribonuklein acid
FMR	Forschungsreaktor Garching bei München
G	Gray
GeV	Gigaelektronen Volt
ICRU	International Commission of Radiation Units and Measurements
KeV	Kiloelektronen Volt
kW	Kilo-Watt
LD ₅₀	letale Dosis 50%
LET	high linear energy transfer = linearer Energietransfer
MRI	Klinikum Rechts der Isar, München
MeV	Megaelektronen Volt
N	Anzahl der verwendeten Mäuse
n	Anzahl der Messpunkte
OER	oxygen enhancement ratio = Sauerstoffverstärkungsfaktor
RBE	relative biologic efficiency = relative biologische Wirksamkeit
t	Zeitpunkt der Messung
V	Durchschnittliches Volumen
x-ray	Röntgenstrahlung

1 Einleitung

1.1 Stellenwert der malignen Tumoren

In den Industrienationen zählen die Tumorerkrankungen und die Anzahl der an bösartigen Tumoren erkrankten Menschen trotz erheblich verbesserter medizinischer Diagnostik und verschiedener Ansätze der Behandlung als zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislaufkrankungen. In Deutschland wurden für das Jahr 2000 210.738 Fälle an bösartigen Neuerkrankungen im Vergleich zu 395.043 Fällen von Herz-Kreislaufkrankungen beim Statistischen Bundesamt registriert. In den USA herrschen ähnliche Verhältnisse.

Zur Behandlung der malignen Erkrankungen stehen drei Methoden zur Verfügung: die Chirurgie, die Chemotherapie und Strahlentherapie, mit jeweils kurativem oder palliativem Ansatz, in Abhängigkeit von der Entität und vom Stadium der Erkrankung.

1.2 Ansatz der Strahlentherapie aus historischer Sicht

Die ersten Versuche, Strahlung als medizinisches Hilfsmittel zu gebrauchen, wurden im Jahre 1896 in der Januarausgabe der Zeitschrift Lancet beschrieben (Roentgen 1931, S. 32). Im Jahre 1897 demonstrierte Wilhelm Alexander Freud, ein deutscher Chirurg, die Möglichkeit der therapeutischen Nutzung von ionisierender Strahlung. 1899 konnte der erste Patient ausschließlich durch strahlentherapeutische Anwendungen von seiner malignen Krankheit geheilt werden. Auf Grund dieser empirischen Erfahrungen kam es in den 20-iger Jahren zur raschen Zunahme des Einsatzes von ionisierender Strahlung zur Bekämpfung von malignen Erkrankungen. Zu diesem Zeitpunkt stützte man sich auf klinische Erfahrungen, da eine fundierte Kenntnis der biologischen Vorgänge in der Zelle unter Bestrahlung noch nicht vorhanden war.

Die klinische Strahlentherapie als medizinisches Teilgebiet etablierte sich erstmalig im Jahre 1922 auf dem „Internationalen Kongress für Onkologie“ in Paris. Coutard und Hautand konnten eine Arbeit vorstellen, welche die Heilung eines Patienten mit Larynxkarzinom im fortgeschrittenen Stadium alleinig durch Radiatio zeigte (Coutard 1932, S. 313-331). 1934 entwickelte Coutard erstmalig ein Schema zur gezielten fraktionierten Applikation von ionisierender Strahlung (Coutard 1934, S. 1-8).

In den folgenden Jahren kam es zu einer dramatischen Wissenserweiterung in der Strahlentherapie und auch deren Grundlagen, insbesondere der Strahlenbiologie.

1.3 Begriff der Strahlenbiologie

Die wissenschaftliche Thematik der Strahlenbiologie ist nach Eric J. Hall (Hall 2000, S. 6) folgendermaßen definiert: „Das Studium des Einflusses von ionisierender Strahlung auf Gewebe, in Abhängigkeit von unterschiedlichen Strahlungsqualitäten und der Beschreibung der physikalischen und chemischen Prozesse, welche in Gang gesetzt werden“ (Hall 2000, S. 5-14).

Prinzipiell wirkt die ionisierende Strahlung sowohl auf gesundes als auch auf krankhaft verändertes Gewebe. Die Aufgabe der Strahlentherapie ist es, die Wirksamkeit der applizierten Strahlung zu erhöhen, ohne den gesunden Organismus, welcher den Tumor bewirkt, zu beeinträchtigen oder zu zerstören. Um dies zu erreichen, gibt es verschiedene Ansätze und Modelle, welche sich einerseits auf Grundlagen der Biologie und Physik, andererseits auf die klinischen Erfahrungen bei der Anwendung von Strahlen am Patienten stützen.

Es wurden verschiedene Begriffe definiert, welche die Wirkung von Strahlung auf Gewebe und deren Vergleichbarkeit beschreiben. Wesentlich ist die Art der applizierten Strahlung, die Art des bestrahlten Gewebes, die Wirksamkeit der verwendeten Strahlung und deren linearer Energietransfer **LET**, die relative biologische Wirksamkeit **RBE** und der Sauerstoffverstärkungsfaktor **OER**.

2 Physikalische und chemische Grundlagen

Die Aufnahme von energetischer Strahlung in biologischem Gewebe kann in Abhängigkeit von der aufgewendeten Energie entweder zur *Exzitation* oder zur *Ionisation* führen. Unter *Exzitation* versteht man das Anheben eines Elektrons, innerhalb eines Atoms oder Moleküls, auf ein höheres Energieniveau. Verwendet man höhere Energie und entfernt dadurch ein oder mehrere Elektronen aus dem Atom- oder Molekülverband, nennt man den Vorgang *Ionisation*. Hochenergetische Photonen wirken aufgrund der freigesetzten Elektronen und ermöglichen mit Hilfe der geeigneten Bestrahlungsgedäte (z.B. Gantry) die zielgenaue Applikation der ionisierenden Strahlung auf den Tumor (Hall 2000, S. 7). Bezogen auf die in der strahlentherapeutischen Anwendung verwendeten Photonen- und Neutronenstrahlung bedeutet dies, dass nicht die insgesamt aufgewendete Energie entscheidend ist, sondern die lokale Konzentration von hochenergetischer Strahlung, um Veränderungen am biologischen Gewebe hervorzurufen (Hall 2000, S. 8-10).

2.1 Direkte und indirekte Wirkung von Strahlung

Der biologische Effekt der Strahlung ist eine partielle oder komplette Zerstörung der DNA. Das gewünschte Ziel einer jeglichen onkologisch-therapeutischen Bestrahlung von biologischem Gewebe ist, ein definiertes Zielvolumen zu treffen und zu zerstören. In der Strahlentherapie beschreibt der Begriff Zielvolumen den zu zerstörenden Tumor einschließlich eines umgebenden Sicherheitsabstandes, welcher sich aus gesundem Randsaum und der Unsicherheit der Applikation zusammensetzt. Dies kann auf zwei unterschiedliche Weisen in Abhängigkeit von der verwendeten Strahlung und deren Energie geschehen:

- erstens eine *direkte* Interaktion der applizierten ionisierenden Strahlung mit der DNA und daraus folgend deren Zerstörung
- zweitens eine *indirekte* Interaktion, welche sekundär zu einer Schädigung der DNA führt.

Bei einer *direkten* Wechselwirkung werden die Atome der DNA direkt ionisiert, was zum Anstoß einer Reaktionskette führt, an deren Ende eine biologische Veränderung steht. Dieser Prozess der direkten Wechselwirkung ist der dominierende, wenn es sich um Strahlung mit einem hohen linearen Energietransfer handelt, wie bei Neutronen oder α -Partikeln (Hall 2000, S. 12).

Bei der *indirekten* Beeinflussung interagiert die applizierte Strahlung mit Atomen oder Molekülen in der Zelle, in den meisten Fällen mit H_2O , um freie Radikale zu bilden,

welche in der Lage sind, weit genug durch das Gewebe zu diffundieren und letztendlich die DNA zu zerstören (Hall 2000, S. 12-14).

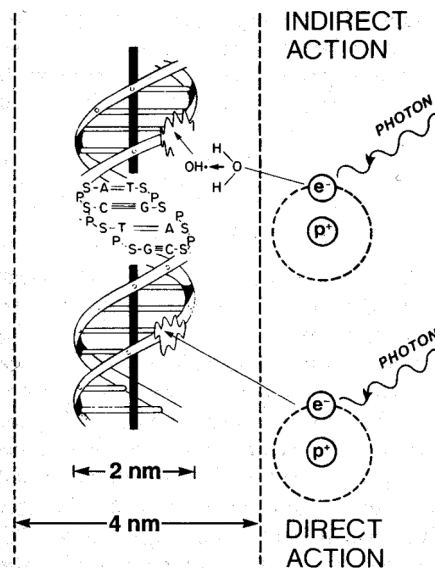


Abbildung 1:

Direkte und indirekte Wirkung von Strahlung auf die DNA (schematische Darstellung); a: Bei direkter Wirkung interagiert ein Elektron, welches durch ein Photon aus einem Atomverband geschlagen wird, mit dem Doppelstrang der DNA. b: Bei der indirekten Wirkung wird ein freies (OH-)Radikal gebildet, welches mit der DNA direkt in Wechselwirkung tritt (Hall 2000, S. 13).

2.2 Relative biologische Wirksamkeit von Strahlung auf Gewebe

Die Quantität der absorbierten Strahlung im Gewebe wird mit der absorbierten Dosis beschrieben, die physikalische Größe ist das Gray (Mould 1993). Gleiche Dosen bei verschiedener Strahlenqualität erzeugen keinesfalls den gleichen biologischen Effekt d.h. 1 Gy Neutronen verursachen einen wesentlich größeren biologischen Effekt als 1 Gy Photonen. Die Ursache des Unterschieds ist auf molekularbiologischer Ebene zu suchen. Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Strahlenarten in ihrer biologischen Wirksamkeit herstellen zu können, muss ein Standard definiert werden, eine s.g. Referenzstrahlung, zu welcher die anderen Strahlungsarten in ihrer Wirksamkeit in Relation gesetzt werden können. Als Referenzstrahlung wurde die Photonenstrahlung gewählt. Die empirisch gewonnenen Daten beim Vergleich von unterschiedlichen Strahlenarten und ihrer unterschiedlichen biologischen Wirksamkeit (dt.: RBW) bei gleicher applizierter Dosis beschreiben die **RBE (Relativ Biological Efficiency)**.

Strahlenart	LET [keV/ μm]
-------------	---------------------------

⁶⁰ Co Photonen		0,2	
250 keV, x-ray		2,0	
10 MeV, Protonen		4,7	
150 MeV Protonen		0,5	
	Spurmittelwert		Energiemittelwert
14 MeV Neutronen	12		100
2,5 MeV α -Teilchen		166	
2 GeV Fe-Ionen		1.000	

Tabelle 1: Unterschiedliche Strahlenart und deren LET (Hall 2000, S. 115)

Beispielhaft kann der Vergleich von schnellen Neutronen zu 250 kV-Röntgenstrahlung zur Bestimmung der RBE herangezogen werden, in dem man die Letalität von Pflanzensamen in Abhängigkeit von der Exposition unterschiedlicher Dosen von Röntgenstrahlung im Vergleich zu einer Gruppe unter der Bestrahlung mit Neutronen heranzieht. Am Ende kann die Äquivalenzdosis von Photonen zu Neutronen bestimmt werden, bei welcher die Hälfte der Samen stirbt (LD_{50}) [Hall 2000, S. 114-116]:

$$RBE = \frac{dose(standard_beam)}{dose(test_beam)} \quad (\text{Perez on CD-ROM})$$

2.2.1 Relative biologische Wirksamkeit unter fraktionierter Strahlung

Wie aus der Abbildung 2 (S.13) ersichtlich, ändert sich bei der Verwendung von hochenergetischer Strahlung wie z.B. Neutronen die RBE in Abhängigkeit von dem verwendeten Fraktionierungsschema. Vergleicht man eine single-dose-Applikation von Neutronenstrahlung mit einer single-dose-Applikation von Photonenstrahlung, zeigt sich, dass unter Neutronenstrahlung in Abhängigkeit von der applizierten Einzeldosis eine lineare Reduktion der überlebenden Zellen stattfindet; dagegen unter Photoneinzeldosen zu Beginn eine deutlich geringere Anzahl an Zellen zerstört wird und erst bei einer Singel-Dosis von 420 rad ein annähernd paralleler Kurvenverlauf erreicht wird. Daraus ergibt sich, dass unter geringen Einzeldosen die Neutronenstrahlung effektiver als die Photonenstrahlung ist, was sich in einer RBE von 3,0 ausdrückt, unter zunehmender Erhöhung der Einzeldosen sich die Effektivität der Photonenstrahlung an die der Neutronenstrahlung annähert und sich die RBE, bei einer Überlebensfraktion von 0,01, auf 1,5 verringert. Die Überlebensfraktion ist der Anteil derer Zellen einer Zellpopulation, welche eine definierte Strahlendosis überlebt haben (Hall 2000, S. 32-37). Bei fraktionierter Strahlungsapplikation verhält sich die Überlebenskurve der

bestrahlten Zellpopulation unter Neutronen vergleichbar zur ermittelten Kurve unter single-dose, aber unter Photonen bedarf es einer deutlich höheren Gesamtdosis, um die angestrebte Überlebensfraktion von 0,01 zu erreichen. Daraus errechnet sich bei einer Überlebensfraktion von 0,01 eine RBE der Neutronen von 2,6 unter fraktionierter Strahlenapplikation (Hall 2000, S. 116).

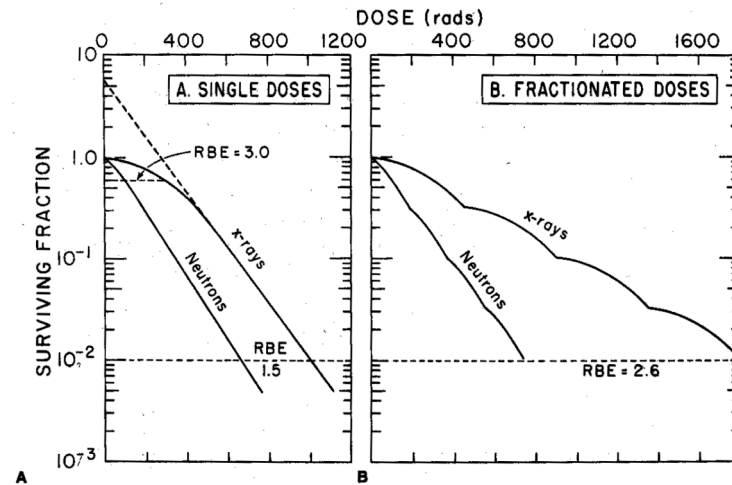


Abbildung 2: Typische Überlebenskurven für Säugerzellen unter Röntgenstrahlung und schnellen Neutronen. A: Einzeldosen. Die Überlebenskurven für Röntgenstrahlung haben eine initial breite Schulter; bei Neutronenstrahlung ist die initiale Schulter schmaler und im Verlauf die Kurve steiler. Daraus resultierend hat die RBE keinen gemeinsamen Wert, variiert mit der Gesamtdosis und wird größer bei reduzierter Einzeldosis. B: Fraktionierte Bestrahlung. Die Schulter der Überlebenskurven tritt nach jeder fraktioniert verabreichten Dosis erneut auf; die Tatsache, dass die Schulter bei den Röntgenstrahlen breiter ausfällt als bei Neutronen, bewirkt eine größere RBE für fraktionierte Bestrahlung (Hall 2000, S. 115).

2.2.2 Relative biologische Wirksamkeit in unterschiedlichen Geweben

Wird in einem Versuchsaufbau zur Bestimmung des RBE nur das bestrahlte Gewebe als einziger Faktor verändert, zeigen sich in der Auswertung doch deutliche Unterschiede in der RBE in Abhängigkeit vom Gewebe. Barendsen et al. (Barendsen und Koot 1966, S. 317-327, Barendsen 1972, S. 120-125) konnten dies anhand von differierenden Zelllinien zeigen. In Abbildung 3 (S. 14) ist die unterschiedliche Wirkung von Röntgenstrahlung und Neutronen auf unterschiedliche Gewebearten ersichtlich.

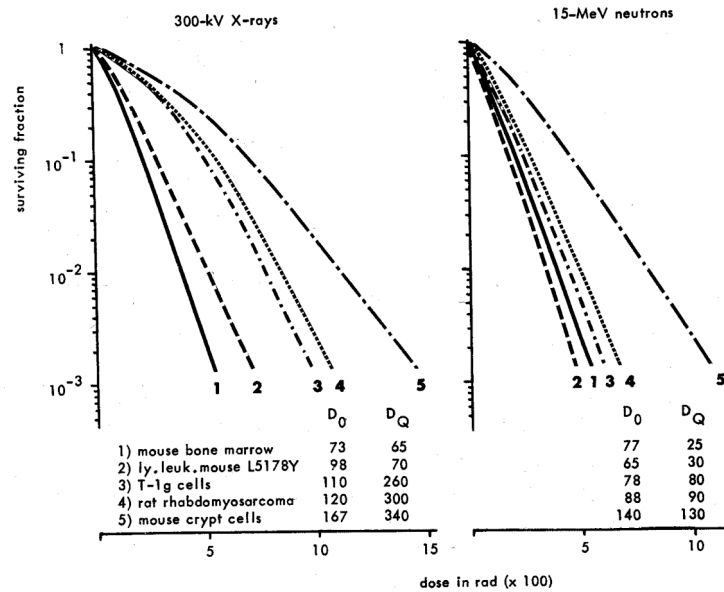


Abbildung 3: Strahlensensibilität unterschiedlicher Gewebe nach Hall (Hall 2000, S. 117).

Überlebenskurven für unterschiedliche Typen von geklonten Kleintier(Nager-)Zellen bestrahlt mit 300 kV-Röntgenstrahlung im Vergleich zu 15 MeV d⁺ T Neutronen:

Kurve 1: haemapoetische Stammzellen; Kurve 2: lymphozytische Zellen; Kurve 3: Zellen von menschlichem Nierengewebe T1 kultiviert; Kurve 4: Rhabdomyosarkom-Zellen der Ratte; Kurve 5: Stammzellen der Kryptenzellen des Darmes der Maus. Die Variation in der Radiosensitivität, bezogen auf unterschiedliche Zellreihen, ist auffallend geringer bei Neutronen im Gegensatz zu konventionellen Röntgenstrahlen (Hall 2000, S. 117, Broerse 1973, S. 305-350).

2.3 Der lineare Energietransfer (LET)

Der LET beschreibt die mikroskopische Energieabgabe von geladenen Teilchen, wie z.B. Elektronen oder Protonen, entlang seiner Spur durch das durchdrungene Gewebe und ist definiert als Energieverlust einer Strahlung durch Ionisation pro Wegstrecke durchstrahlten Gewebes, gemessen in keV/ μm (Hall 2000, S. 113, Perez on CD-ROM, Ries 1985, S. 9-10, Zirkle 1954, S. 315-350).

Die entsprechende Formel nach der „International Commission on Radiological Units“ von ICRU 1962 lautet (Hall 2000, S. 113):

$$LET = \frac{dE}{dl} \text{ in } \left(\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}} \right)$$

dE = übertragene Energie

dl = durchquerte Länge

Ein typischer LET-Wert für die Energieabgabe von Elektronen, welche aus einer ^{60}Co - Gammastrahlung emittiert werden, ist $0,28 \text{ keV}/\mu\text{m}$, für Neutronen eines $6,2 \text{ MeV}$ -Zyklotron beträgt der LET-Wert $21 \text{ keV}/\mu\text{m}$ (Abel 1966, S. 57-63). Dies macht deutlich, dass bei Hoch-LET-Strahlen, wie z.B. Neutronen, die Energieabgabe an das bestrahlte Gewebe, bezogen auf die gleiche Wegstrecke, 100-mal höher sein kann, als bei Applikation von konventioneller Röntgenstrahlung. Im biologischen Gewebe bedeutet dies eine deutliche Zunahme der Möglichkeit einer irreversiblen DNA-Schädigung unter Verwendung von Neutronen (Ries 1985, S. 10; Kummermehr 1989, S. 276-282).

2.4 Die Beziehung des RBE zum LET

Der LET selbst wurde nicht für biologisches Gewebe definiert. Um eine Aussage in bezug auf biologisches Gewebe zu bekommen, ist die gebräuchlichste Darstellung der RBE als Funktion des LET. Mit Anstieg des LET nimmt auch die RBE zunächst langsam und dann rasch zu, bis der LET einen Schwellenwert von $10 \text{ keV}/\mu\text{m}$ erreicht. Zwischen 10 und $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ steigt die RBE zusammen mit dem LET rasch an und erreicht bei $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ihr Maximum und somit einen Umschlagspunkt, nach dem die RBE wieder abfällt. Daraus lässt sich ableiten, dass die höchste biologische Wirksamkeit in lebendem Gewebe bei einem LET von $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ erreicht wird. Strahlenbiologisch lässt sich das so erklären: Exakt bei diesem LET-Wert wird der größte biologische Effekt erzielt, da bei dieser Dichte der ionisierenden Strahlung die Distanz zwischen den einzelnen ionisierenden Ereignissen in etwa dem Durchmesser der Doppelstranghelix der DNA entspricht. Somit ist die größte Wahrscheinlichkeit eines Doppelstrangbruches mit dem daraus resultierenden größten biologischen Effekt erreicht (Hall 2000, S. 119). Daraus lässt sich auch die relativ höhere biologische Wirksamkeit von Strahlung mit hohem LET, wie z.B. Neutronen-Strahlung, erklären.

2.5 Der Effekt der Oxygenierung in der Strahlentherapie

Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen chemischen Substanzen, die den biologischen Effekt von ionisierender Strahlung beeinflussen. Eine herausragende Rolle spielt der Sauerstoff. Insbesondere der Sauerstoffgehalt im Tumor ist von großer Bedeutung, da die Wirkung der ionisierenden Strahlung stark vom Vorhandensein von O_2 abhängt. Erstmals machte Schwartz 1912 in Deutschland die Beobachtung, dass eine Radiumquelle eine weitaus geringere Rötung auf seinem Unterarm hervorrief, wenn der ionisierende Strahlung aussendende Applikator mit Druck auf die Haut gepresst wurde. Dies war der erste Beweis, dass sich die Wirkung von Strahlung mit der Abwesenheit

von Sauerstoff, bedingt durch die geminderte Perfusion im Gewebeareal, welches dem Druck des Applikators ausgesetzt ist, reduziert.

Petry untersuchte 1923 durch Versuche mit Gemüsesamen die Korrelation zwischen Radiosensitivität und der Anwesenheit von Sauerstoff (Hall 2000; S. 91). 1930 wurden in England weitere Versuche durch Mottram durchgeführt, welche den Einfluss von Sauerstoff auf die Wirksamkeit von ionisierender Strahlung bestätigten. Diese Untersuchungen blieben weitgehend unbeachtet, bis schließlich durch Veröffentlichungen von Read und Gray die Aufmerksamkeit eines breiteren Forscherkreises auf diesen Effekt gelenkt wurde (Mottram 1936, S. 606; Read 1952, S. 89; Gray 1953, S. 638). Bei all diesen Versuchen ging es um den Sauerstoffverstärkungsfaktor, welcher die Wirkung von ionisierender Strahlung auf Gewebe unter anaeroben Bedingungen beschreibt und in Relation hierzu die deutliche Wirkungsverstärkung unter aeroben Bedingungen.

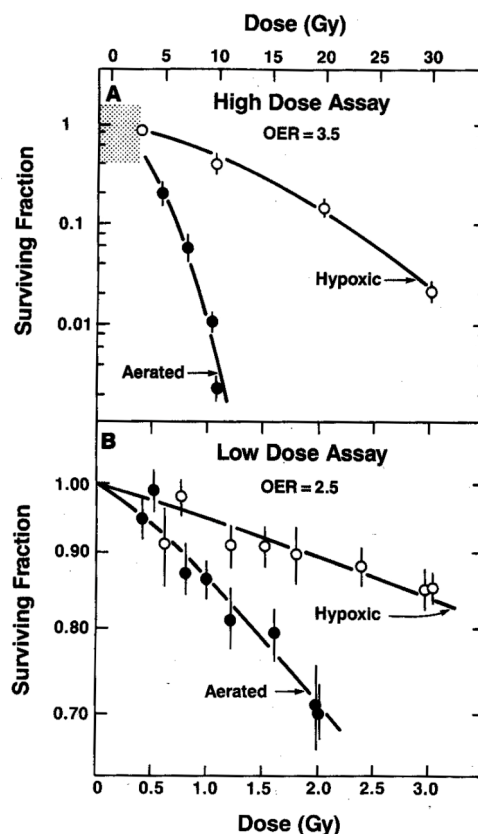


Abbildung 4: Zellüberlebenskurven in Abhängigkeit von der Dosis; differenziert nach O₂-reich und O₂-arm nach Palcic. Zellen sind viel strahlensensibler unter Anwesenheit von Sauerstoff als bei Abwesenheit von O₂. Die differierende Höhe der Dosis unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen, die verabreicht werden muss, um den gleichen biologischen Effekt zu erzielen, wird mit dem Sauerstoffverstärkungsfaktor (OER) beschrieben (Palcic 1984, S. 328-339).

2.5.1 Sauerstoffverstärkungsfaktor

Vergleicht man unter identischen Bedingungen bestrahltes Gewebes, einmal unter Anwesenheit und einmal unter Ausschluss von Sauerstoff, lässt sich nachweisen, dass bei niedrig energetischer Strahlung wie z.B. Photonenstrahlung die 2,5- bis 3-fache Dosis im hypoxischen Gewebe appliziert werden muss, um die gleiche RBE zu erreichen, wie in gut oxygeniertem Gewebe. Diesen Faktor, der mit der applizierten Strahlendosis multipliziert werden muss, nennt man Sauerstoffverstärkungsfaktor (oxygen enhancement ratio = OER) (Hall 2000, S. 91-92).

OER = Dosis in hypoxischem Milieu/Dosis in normoxischem Milieu

$$OER = \frac{\text{Dosis} - \text{in} - \text{hypoxischem} - \text{Milieu}}{\text{Dosis} - \text{in} - \text{normoxischem} - \text{Milieu}}$$

Wie in der Abbildung 5 (S. 18) ersichtlich, ist der OER direkt abhängig von der Qualität, Quantität und Art der Strahlung, welche verwendet wird. Vergleicht man die Wirkung von Neutronen mit einem hohen LET, mit der Wirkung von Photonen unter der Anwesenheit oder Abwesenheit von O₂, zeigt sich, dass im Ergebnis die Wirkung von Neutronen in deutlich geringerem Maße durch den Sauerstoff beeinflusst ist, als dies bei Photonen der Fall ist (Palcic 1984, S. 138).

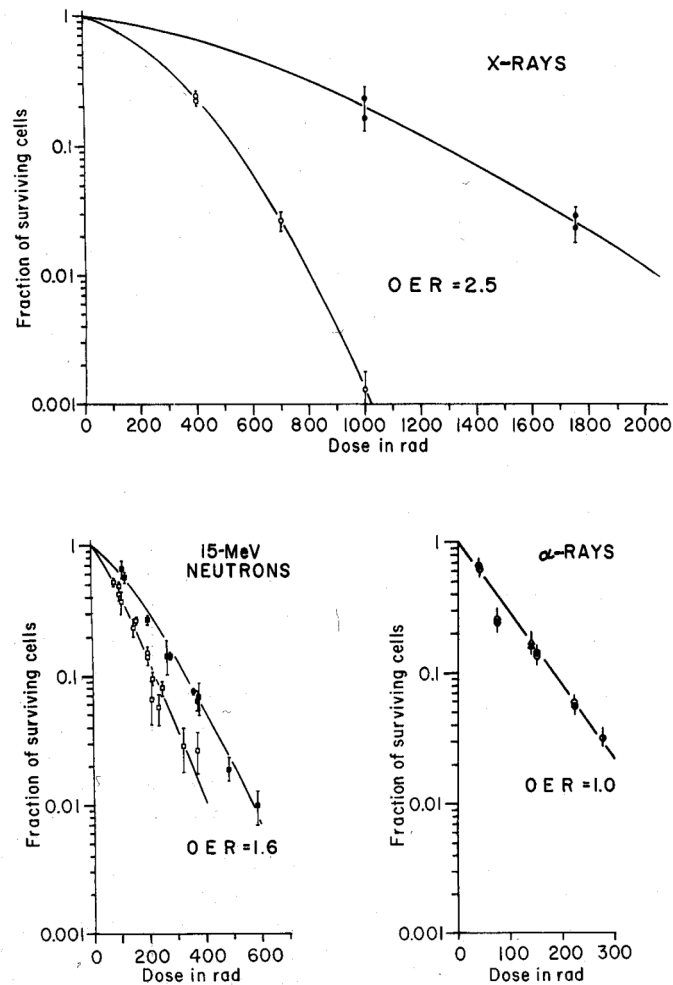


Abbildung 5: Der Sauerstoffverstärkungsfaktor (OER) (Barendsen 1966, S. 317).

OER für verschiedene Arten von Strahlung. Konventionelle Röntgenstrahlung hat einen OER von 2,5; Neutronen liegen dazwischen mit einen OER von etwa 1,6 (Barendsen 1966, S. 317; Hall 2000, S. 93); der OER für α -Partikel ist zu vernachlässigen.

2.5.2 Mechanismus des Oxygenierungseffektes in ionisiertem Gewebe

Durch verschiedene Versuche konnte ermittelt werden, dass nicht notwendigerweise O_2 während des Bestrahlungsvorganges vorhanden sein muss, aber zumindest direkt im Anschluss, d.h. im Bereich von Millisekunden nach Radiatio. Aus diesen Beobachtungen lassen sich Rückschlüsse auf den Mechanismus des Oxygenierungseffektes ableiten. Die Strahlenabsorption führt im Gewebe zur Produktion von geladenen Teilchen. Auf ihrem Weg durch das Gewebe produzieren sie Ionenpaare mit sehr kurzer Lebensdauer (10^{-10} s). Diese Ionenpaare bringen freie Radikale hervor, welche aufgrund eines ungepaarten Valenzelektrons (Lebensdauer: 10^{-5} s) hochreaktive Moleküle sind.

Mit Hilfe dieser freien Radikale werden chemische Brücken aufgebrochen und eine Kette von chemischen Reaktionen in Gang gesetzt, welche an ihrem Ende einen biologischen Schaden hinterlassen (siehe S.11, Abb.1). Ist während dieser Phase Sauerstoff vorhanden, reagiert dieser mit den freien Radikalen und es entsteht eine neue organische Verbindung, in welcher das freie Radikal gebunden wird. Folge dieser Reaktion ist eine Änderung der chemischen Zusammensetzung der DNA, wodurch Selbstreparationsvorgänge seltener stattfinden können.

Zusammenfassend kann man sagen: Die Anwesenheit von Sauerstoff fixiert den entstandenen Strahlenschaden unter Verhinderung von Autoreparationsvorgängen der DNA (Hall 2000, S. 93-94).

2.5.3 Mechanismus der Reoxygenierung in ionisiertem Gewebe

Primär basierte die klinische Anwendung der Strahlentherapie auf empirischen Erfahrungen. Kaplan (Kaplan 1970, S. 460-476) konnte zeigen, welchen Einfluss und welchen Benefit strahlenbiologische Modelle für die klinische Anwendung darstellen. Untersuchungen der von ionisierender Strahlung verursachten DNA-Schäden ergaben ein Grundverständnis über einen subletalen Schaden und einen potentiell letalen Schaden und deren Reparationsvorgänge (Elkind 1990, S. 2165-2171; Weichselbaum 1982, S. 511-513). Mit diesen Vorgaben konnten rationale Entscheidungen über Fraktionierungsschemata getroffen werden. Zusätzlich konnte aus diesen Experimenten auch Wissen um den Einfluss der Reoxygenierung von Tumorgewebe unter Bestrahlung gewonnen werden (Kallman 1972, S. 135-142).

Mit dem Wissen um die wesentlich höhere Strahlensensibilität von gut oxygeniertem Gewebe gegenüber schlecht oxygeniertem Gewebe muss die richtige Relation von der Höhe der applizierten Dosis und der Häufigkeit der Bestrahlungsfractionen gefunden werden, um zum nächsten Bestrahlungszeitpunkt eine möglichst große Population von gut oxygenierten und damit strahlensensibleren Zellen vorzufinden. Direkt im Anschluss an eine Bestrahlung nimmt der relative Anteil der hypoxischen Zellen stark zu. Darum ist es von großem Interesse, die Zeitspanne bis zur nächsten Bestrahlung so zu wählen, dass der Anteil der normoxischen Zellen in der Restpopulation wieder ansteigt oder evtl. überwiegt, und somit die Strahlenwirkung zunimmt. Dieser Vorgang wird als Reoxygenierung bezeichnet. Kommt es, wie bei einem fraktionierten Bestrahlungszyklus üblich, zu einer erneuten Bestrahlung, wird erneut ein großer Anteil der sauerstoffreichen Zellpopulation abgetötet. Nun beginnt erneut der Prozess der Reoxygenierung. Wiederholt man diesen Vorgang mehrmals, wird die Tumorzellpopulation stetig verkleinert (Hall 2000, S. 103-107).

2.6 Verhalten und Abhängigkeit der einzelnen Parameter zueinander (RBE, LET, OER)

Anhand einer graphischen Darstellung (Abbildung 6, siehe unten) lässt sich am übersichtlichsten die Beeinflussung und die gegenseitige Abhängigkeit der Charakteristika einer Strahlung, welche bei Applikation von ionisierender Strahlung in biologischem Gewebe auftreten, aufzeigen. Diese Darstellung zeigt in Form einer Funktion die Veränderung der relativen biologischen Wirksamkeit in Abhängigkeit vom linearen Energietransfer und somit von der Strahlenqualität. Als zweite Funktion wird der Einfluss des Sauerstoffverstärkungsfaktors (OER) auf die relative biologische Wirksamkeit von Strahlung dargestellt und wie sehr der Sauerstoffverstärkungsfaktor (OER) von der verwendeten Strahlungsart abhängt. Es zeigt sich ein deutlicher Effekt des OER bei einer Strahlung mit niedrigem linearen Energietransfer (LET). Je weiter der LET ansteigt, um so deutlicher vermindert sich die Wirkung des OER.

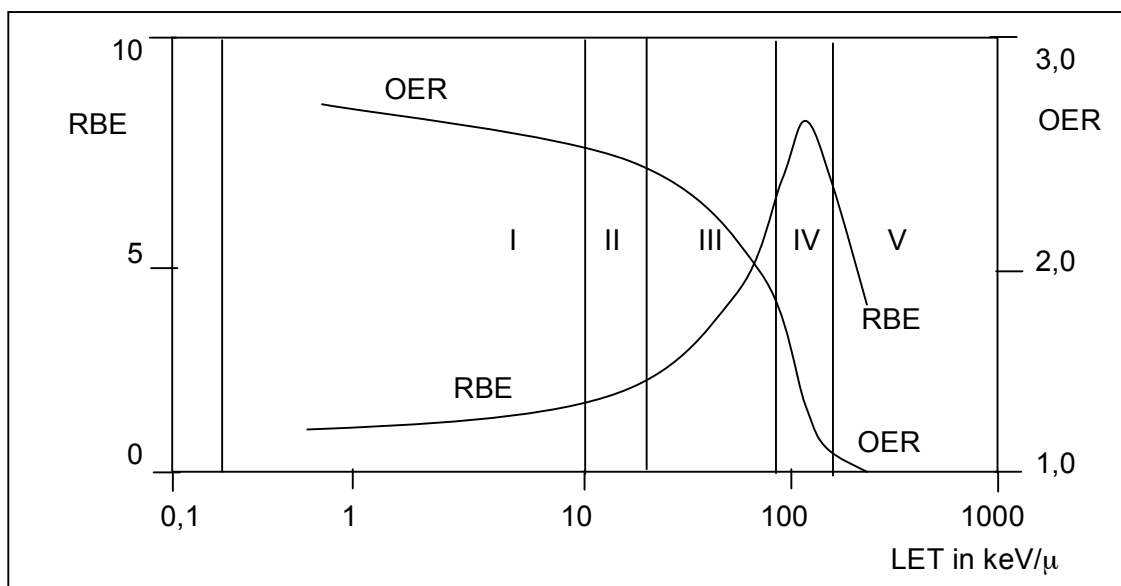


Abbildung 6: Die relative biologische Wirksamkeit (RBE) und der Oxygenierungseffekt (OER) als Funktion des linearen Energietransfers (LET) unter verschiedenen Strahlenqualitäten. In der Versuchsanordnung von Barendsen wurden humane T_1 -Nierenzellen verwendet und mit α -Partikeln oder Deuteronen bestrahlt (Barendsen 1972, S. 120-125).

2.7 Problemstellung

Seit ca. 50 Jahren ist bekannt, dass die Oxygenierung ein wichtiger Faktor in der Strahlentherapie ist. Darüber hinaus zeigen sich hypoxische Tumore häufig resistent gegen konventionelle Bestrahlungsregime (Adams 1991, S. 420-421; Gatenby 1988, S. 831-838; Höckel 1996, S. 4509-4515).

Aufgabe dieser Arbeit ist es, das Verständnis der biologischen Verhaltensweisen von Tumoren unter Radiotherapie zu erweitern, um in Zukunft neue Therapiekonzepte entwickeln zu können.

In bisherigen strahlenbiologischen Arbeiten über das Oxygenierungsverhalten von Tumoren (Fleckenstein 1990, S. 81-90) wurden in der Mehrzahl der Studien hohe Einzeldosen von konventioneller Strahlung verabreicht (Adam 1999, S. 173-174; Afzal 1991, S. 473-477; Grau 1990, S. 309-315). Lediglich in der Arbeit von Zywiets (Zywiets 1995, S. 1391-1400) wurde der intratumorale Sauerstoffpartialdruck $[pO_2]$ mittels Eppendorf-Histogramm unter fraktionierter konventioneller Bestrahlung untersucht. In unseren Untersuchungen an murinen Mamma- und Osteosarkomen sollte, in enger Anlehnung an klinische Bestrahlungsregime, das Tumorstadiums- und Oxygenierungsverhalten sowohl unter konventioneller als auch unter Neutronentherapie beobachtet werden.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollte bei Verwendung fraktionierter Therapieprotokolle mit unterschiedlich hohen Einzeldosen der Einfluss auf das Wachstumsverhalten geklärt werden. Diese Versuche wurden anhand zweier unterschiedlicher Tumormodelle im Rahmen einer Bestrahlung mit Photonen und Spaltneutronen durchgeführt.

In einem zweiten Abschnitt sollte die Arbeit die Unterschiede im Oxygenierungsverhalten der beiden Tumormodelle unter Niedrig-LET-Strahlung mit unterschiedlichen Einzeldosen und Hoch-LET-Strahlung aufzeigen und letztendlich klären, ob die Reoxygenierung von der Strahlungsart und dem verwendeten Fraktionierungsschema abhängig ist.

Im dritten Abschnitt wurde die Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdruckes vom Tumorstadium untersucht. Dabei wurde im speziellen auf den Einfluss des jeweiligen Tumorstadiums eingegangen. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob eine eventuelle Sauerstoffpartialdruck-Volumen-Relation nur unter ungebremstem Tumorstadium besteht, oder ob auch unter Bestrahlung ein ähnlicher Effekt nachgewiesen werden kann.

Die Vorgabe für den gewählten Versuchsaufbau war eine möglichst enge Anlehnung an den klinischen Alltag, was Niederschlag fand in der Wahl der verwendeten Tumorstadium-

modelle mit einem gut oxygenierten Osteosarkom auf der balb C-Maus und einem niedrig oxygenierten AT 17-Adenokarzinom auf der C3H-Maus und in der Wahl der Fraktionierungsschemata. Wichtig war letztlich, das Verhalten eines Tumors vom Beginn bis zum Ende des Versuchs kontinuierlich zu untersuchen, um zu klären, ob das wiederholte Messen des pO_2 mit der Feinnadelsonde von Eppendorf einen Einfluss auf die gewonnenen Messergebnisse hat.

3 Material

3.1 Versuchstiere und Tumormodelle

Zur Durchführung der Experimente wurden zwei verschiedene Mäusestämme verwendet, die auch unterschiedliche Tumoren trugen. Auf die C3H-Maus wurde das Adenokarzinom AT 17 und auf die Balb C-Maus das Osteosarkom OTS-64 übertragen.

3.1.1 C3H-Maus und Adenokarzinom AT 17

Für das Experiment wurden ausschließlich weibliche Inzuchtmäuse vom Stamm C3H verwendet. Bezugsquelle war die Firma Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld am Main. Bei Anlieferung hatten die Mäuse ein Körpergewicht von 15 bis 20 Gramm und waren 6 bis 8 Wochen alt. Erreichte ein Versuchstier das Körpergewicht von 20 Gramm, so wurde der Tumor in die rechte Flanke der Maus implantiert.

Bei einem Adenokarzinom AT-17 handelt es sich um ein gering- bis undifferenziertes, langsam wachsendes Mammakarzinom der C3H-Maus, das durch Strahleninduktion ausgelöst wurde und eine Verdoppelungszeit von 8 bis 10 Tagen hat. Selbst bei großen Tumorumfängen treten bei diesen Adenokarzinomen selten Nekrosen auf. Sie tendieren jedoch, ähnlich wie die humanen Plattenepithelkarzinome, zur Keratinbildung (Kummermehr 1983, S. 19-24).

3.1.2 Balb C-Maus und Osteosarkom

Anfänglich wurden tumortragende Tiere von der GSF/Neuherberg bezogen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden diese Versuchstiere von der Firma Charles Wiga Deutschland GmbH geliefert und der Tumor im Labor selbst in die rechte Oberschenkelmuskulatur implantiert. Dieser Tumor wurde durch wiederholte Gabe von ^{224}Ra induziert und hat eine Tumorerdoppelungszeit von 7 bis 9 Tagen. Dieser Tumor ist gut oxygeniert, zeigt aber mit Größenzunahme Nekroseareale und hat eine Tendenz zur Kalzifizierung (Kummermehr 1982, S. 38-41).

3.2 Geräte

3.2.1 Strahlenapplikation am RT 100

Zur Erzeugung von Photonen wurde ein Orthovolt-Bestrahlungsgerät RT 100 der Firma Siemens verwendet.

Um mit diesem Gerät eine homogene Dosisverteilung über das gesamte Tumorumfängen und eine größtmögliche Schonung des Normalgewebes zu erreichen, wurde

ein individueller Bestrahlungstubus angefertigt, mit dem 4 Tiere gleichzeitig bestrahlt werden konnten.

Der Abstand wurde durch einen trichterförmigen Tubus (Länge 30 cm, Durchmesser 8 cm) bei allen Bestrahlungen am RT 100 konstant gehalten. An der distalen (der Strahlenquelle entfernten) Öffnung wurde eine Scheibe aus Aluminium (Dicke 4 mm) mit aufgedoppelter Bleiplatte (Dicke 1,3 mm) durch 3 Klemmschrauben fixiert; in der Bodenplatte waren 4 Öffnungen gefräst (Durchmesser 2,4 cm), durch diese ragten 4 Messingzylinder (Länge 2,5 cm; Außendurchmesser 2,4 cm; Innendurchmesser 2 cm). Um die aus der konventionellen Röntgenröhre am RT 100 (100 kV/8 mA) emittierte Strahlung aufzuhärten, wurde zusätzlich ein Cu-Filter von 0,3 mm verwendet, um eine homogene Tiefendosisverteilung zu erreichen. Zusätzlich wurden die Mäuse über laterale Gegenfelder bestrahlt. Die aufgedoppelte Bleischeibe verhinderte eine ungewollte Ganzkörperbestrahlung der Maus. Erstellt wurde der Applikator nach eigenem Entwurf in der Werkstätte der Strahlentherapie des MRI.

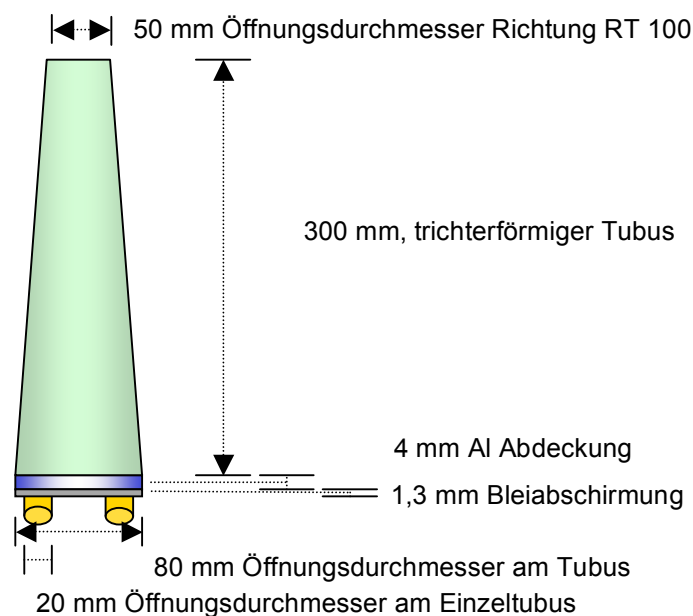


Abbildung 7: Schematische Darstellung des trichterförmigen Tubus für die Photonenbestrahlung am RT 100 Orthovoltgerät

3.2.2 Strahlenapplikation am Reaktor in Garching

Die Bestrahlung mit Neutronen erfolgte am FRM I-Forschungsreaktor in München/Garching (4 MW-Leichtwasserreaktor). Ein Neutronenkonverter erzeugt aus den primär thermischen Neutronen schnelle Spaltneutronen, die sich durch eine mittlere Geschwindigkeit von 16.000 km/s für den Versuch eignen (Köster 1984, S. 79-96).

Hierzu wird eine Metallplatte aus einer ^{235}U -Aluminium-Verbindung an den Reaktorkern angeschwenkt. Dadurch werden aus dem primär thermischen Neutronenfluss etwa 10^{15} schnelle Neutronen pro Sekunde und gleichzeitig etwa 10^{16} Photonen pro Sekunde erzeugt. Um den Gammastrahlungsanteil der austretenden Strahlung zu verringern, wurde eine 2,5 cm Bleiplatte eingesetzt. Somit konnte der Photonenanteil am RENT I-Strahl auf 25 %, gemessen in 2 cm Tiefe reduziert werden, was zu einer therapeutisch akzeptablen Photonendosis führt (Ries 1985, S. 16). Die dabei entstehende Wärmeleistung von etwa 12 kW wird durch das den Reaktorkern umgebende Wasser abgeführt. Die Neutronen- und Photonenstrahlung kann durch ein 5 Meter langes tangentes Strahlrohr in den Behandlungsraum austreten.

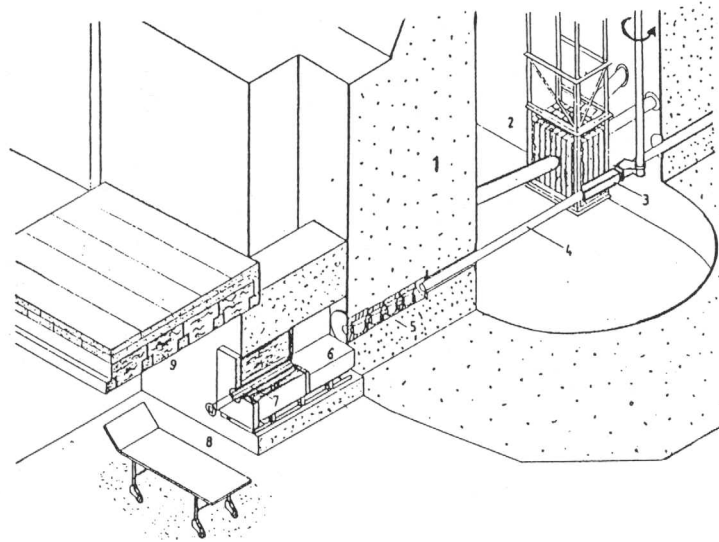


Abbildung 8: Reaktor im Aufriss

Das Core (2) wird von einer Wassersäule und einer Betonabschirmung (1) umgeben. Die Konverterplatte (3) ist anguliert, um die entstehenden schnellen Neutronen und Photonen durch das tangentielle Strahlrohr (4), durch den Shutter (5), das Filtersystem (6) und die Dosimetrieinheit zu lenken. Der Strahl trifft anschließend im Behandlungsraum (9) auf den Versuchsaufbau (8).

3.2.3 Sigma-Eppendorf-pO₂-Histogramm/KIMOC

Der pO₂-Histogramm wurde von der Firma Eppendorf zur Messung des Sauerstoffpartialdrucks im Gewebe mittels polarographischer Feinnadelsonden entwickelt. Dieses Messprinzip ermöglicht kontinuierliche in-vivo Messungen des pO₂ im Tumorgewebe mit einer geringst möglichen konsekutiven Gewebsschädigung.

3.2.3.1 Physikalisches Messprinzip

Die Tumorgewebe-Oxygenierung bzw. der Sauerstoffpartialdruck wurde mittels einer Feinnadel-O₂-Elektrode polarographisch gemessen. Dabei wird eine membranbedeckte Messelektrode am Gold mit einer Polarisationsspannung von 700 mV negativ gegen eine Ag/AgCl-Gegenelektrode vorgespannt. Der im Messkreis fließende Strom ist in seiner Stärke (0,01 bis 2,00 nA) proportional zum Sauerstoffpartialdruck im Gewebe. Dabei zur Kathode gelangende O₂-Moleküle werden im sauren Elektrolyt zu H₂O und entsprechend im neutralen oder alkalischen Elektrolyten zu Hydroxylionen reduziert.

Saurer Elektrolyt:	$O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2 H_2O$
Neutraler/ Alkalischer Elektrolyt:	$O_2 + 4e^- + 2 H_2O \rightarrow 4OH^-$

Der Sauerstoffpartialdruck schwankt im Gewebe zwischen 1 und 100 mmHg, je nachdem, ob in der Nähe von O₂-Verbrauchern (Mitochondrien) oder O₂-Liferanten (Arterien, Mikrokapillaren) gemessen wird. Um eine reproduzierbare Aussage über die Sauerstoffversorgung des Gewebes machen zu können, ist es daher notwendig, viele Messpunkte in einem großen Gewebegebiet zu erfassen. Dies geschieht unter Einsatz des Sigma-pO₂-Histogrammen weitgehendst automatisch mit Hilfe eines mikroprozessorgesteuerten Manipulators. Dieser bewegt die Feinnadelsonde in einem Pilgerschrittverfahren durch das Gewebe. Der typische Pilgerschritt besteht aus einer 1,0 mm-Vorwärtsbewegung und einer 0,3 mm-Rückwärtsbewegung mit anschließender Messwerterfassung. Die Rückwärtsbewegung entlastet das Gewebe und verhindert somit durch Gewebekompression hervorgerufene Messartefakte (Schramm 1990, S. 38-50). Die maximale Eindringtiefe mit diesem Verfahren beträgt 50 mm, kann jedoch vom Benutzer variiert werden. Maximal können 200 Messpunkte pro Messvorgang erfasst werden (Eppendorf, Bedienerhandbuch 1995, S. 5). Diese Methode der pO₂-Messung wurde bereits in zahlreichen Publikationen beschrieben. Dabei wurden Messungen an humanen und tierexperimentellen Tumoren (Zywietz 1995, S. 1391-1400) durchgeführt.

3.2.3.2 Kalibrierung

Vor den eigentlichen Messungen erfolgte zunächst die Kalibrierung der jeweils verwendeten Feinnadelsonde in steriler physiologischer NaCl-Lösung. Zum Systemabgleich wurde nach jeder Messung eine erneute Kalibrierung durchgeführt. Hierbei

durchströmte abwechselnd steril gefilterte Luft und reiner N₂ die Kalibrierungslösung. So wurde der 100 %-ige und 0 %-ige O₂-Partialdruck in Abhängigkeit des Luftdrucks und der Temperatur für den jeweiligen Messvorgang ermittelt (Eppendorf, Bedienerhandbuch 1995, S. 5-6). Der jeweilige Luftdruck am Tag der Messung wurde mit Hilfe eines im Eppendorf-Gerät integrierten Barometers erfasst und in die Berechnung des Sauerstoffpartialdrucks einbezogen. Zur weiteren Berechnung wurde die Zimmertemperatur mittels eines Thermometers bestimmt und als zusätzlicher Parameter eingegeben, da der O₂-Partialdruck in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur und des Luftdrucks steht.

3.2.4 Wärmeregulator

Unter der Annahme, dass der Sauerstoffpartialdruck im Gewebe temperaturabhängig ist, war es nötig, für eine konstante Körpertemperatur der narkotisierten Maus während des Messvorganges zu sorgen. Ausgehend von der in den veterinärmedizinischen Schriften postulierten durchschnittlichen Körpertemperatur von $38,5 \pm 0,2$ °C bei Kleintiernagern, konnte in der Versuchsanordnung ein Temperaturabfall von durchschnittlich 4,5 °C nach 10 Minuten Narkose (unter Ketanest/Rompun gewichtsadaptiert) beobachtet werden. Dieser Körpertemperaturabfall unter Narkose wurde in einem Vorversuch mittels rektal applizierter fiberoptischer Licox-Messelektrode ermittelt. Um diesen Temperaturabfall zu vermeiden, wurde die Messanordnung um eine Messfühlergesteuerte elektronische Temperaturschaltung erweitert. Es handelt sich um einen Eigenbau aus den Komponenten der Temperaturschaltung mit Fühlerüberwachung (als Baukit der Firma Conrad Elektronik Bestell-Nr. 19 20 82 77) und einer handelsüblichen Rotlichtlampe mit einer Leistung von 100 Watt. Durch erneute Reihenversuche wurde der optimale Abstand der Lampe zur Maus auf 80 cm festgelegt und der Temperaturregler auf einen An-/Abschaltmodus von 38 ± 1 °C eingestellt.

Darüber hinaus erfolgte eine kontinuierliche Körpertemperaturmessung durch eine rektal applizierte Messsonde des Licox Messsystems (Licox MCB Universal Oxygen and Temperature Monitor, Havard Apparatus). Bei der Messsonde handelt es sich um eine Polyethylen-ummantelte Mikrosonde, welche eine computergestützte Online-Erfassung der Temperatur ermöglicht. Diese Messung war vom Regelkreis entkoppelt und diente lediglich zur Kontrolle.

Diese Anordnung garantierte einen geringen Wärmeverlust des Tierkörpers während des Messvorganges.

4 Methoden

Das Tierexperiment wurde nach dem Tierschutzgesetz in der Fassung vom 17.02.1993 durch die Regierung von Oberbayern mit Bescheid vom 12.04.1994 unter dem Aktenzeichen 211-2531[^]-57/92 genehmigt. Das bayrische Staatsministerium für Umweltschutz und Landesfragen ermöglichte durch finanzielle Unterstützung den Aufbau des Versuchs und dessen Durchführung.

4.1 Tierhaltung und Versorgung

Die Tierhaltung während der Versuchszeit erfolgte im gemeinsamen Tierstall der nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik und der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie des Klinikums Rechts der Isar, München. Dabei waren jeweils fünf Tiere in einem Kunststoffkäfig untergebracht und wurden mit pelletiertem Trockenfutter, sowie mit Leitungswasser aus Nippeltränkeflaschen ernährt. (Altromin 1324, Haltungsdiät-Ratten und Mäuse; Altromin GmbH & Co., D-32791 Lage.) Als Einstreu wurden Sägespäne der gleichen Firma verwendet. Die Raumtemperatur lag bei 26 ± 2 °C. Die Einhaltung eines regelmäßigen Tag-Nacht-Rhythmus erfolgte über eine elektronische Steuereinheit im 12-Stundenwechsel.

4.2 Narkose und Transplantation

Zur Gewinnung von Tumormaterial wurde jeweils eine tumortragende C3H-Maus oder eine halb C-Maus in Ätheratmosphäre getötet. Anschließend wurde der Tumor entfernt und in eine vorbereitete ca. 30 °C warme und sterile Lösung gegeben. Diese bestand zu gleichen Volumenanteilen aus 20 %-iger Glukose-Lösung und Ringer-Laktat-Lösung.

Der Tumor wurde gereinigt, gespült und anschließend in einem neuen Lösungsgemisch obiger Zusammensetzung in annähernd kubische Stücke einer Kantenlänge von 2 mm geteilt. In dieser Lösung verblieb der Tumor zur Aufnahme von Nährstoffen für mindestens 2 Stunden. Durch diese Prozedur wird bei Implantation eine deutlich höhere Anwachsrate (bis zu 80 %) erreicht.

Zur Transplantation wurden die Mäuse mittels i.p.-Injektion narkotisiert. Als Narkotika wurden Ketamin und Xylacin in einem Mischverhältnis 100 : 16 mg pro kg Maus verwendet.

Das Mischungsverhältnis setzt sich folgendermaßen zusammen:

- 5 ml Ketavet® einer 100 mg/ml Lösung Ketamin
- 4 ml Rompun® einer 20 mg/ml Lösung Xylazin
- gelöst in 41 ml 0,9 % ige NaCl

Unter Verwendung von 0,2 ml (entsprechen 2 mg Ketamin und 0,32 mg Xylacin) dieser Injektionslösung konnte eine etwa 20 g schwere Maus für die Dauer von etwa 40 Minuten narkotisiert bleiben. Dieser Zeitraum war für die Durchführung der Tumortransplantation ausreichend.

Das AT-17-Adenokarzinom wurde in die rechte Flanke der C3H-Maus implantiert. Dabei wurde, nach Rasur der Implantationsstelle, ein ca. 5 mm langer sagitaler Hautschnitt gesetzt. Anschließend erfolgte die subkutane Mobilisation der Haut auf einer Länge von ca. 1 cm nach kranial. Danach wurde das Tumormaterial mit einer anatomischen Pinzette eingebracht und die Wunde mit dem Gewebekleber Histoacryl® (Firma Braun/ Melsungen) verklebt.

Die Implantation des Osteosarkoms OTS-64 in die halb C-Maus erfolgte über einen tieferen intramuskulären Schnitt in den rechten hinteren Oberschenkel der Maus. Die zuvor präparierten Tumorstückchen wurden möglichst nahe dem rechten Femur eingebracht.

4 bis 5 Wochen später erreichte der Tumor das gewünschte Volumen von 600 ± 50 ml und konnte in den experimentellen Zyklus eingeschleust werden.

4.3 Strahlenapplikation am RT 100

Die Festlegung der Gesamtdosis pro Bestrahlungszyklus erfolgte durch Vorversuche an gleichen Tier- und Tumormodellen. Dabei wurde eine Gesamtdosis von 36 Gy als geeignet ermittelt, um eine deutliche Wachstumsverzögerung des Tumorumfanges mit Ausbildung einer Schulterkurve über einen Zeitraum von drei Wochen und eine nachgewiesene Plateaubildung ab der dritten Woche zu erreichen (siehe Abbildung 14, S. 41).

Die eigentlichen Bestrahlungszyklen wurden identisch sowohl für die AT-17-Adenokarzinom-tragende C3H-Maus, als auch für die OTS-64 tragende halb C-Maus durchgeführt. Dazu wurden jeweils vier zu bestrahlende Mäuse in gleicher Weise wie zur Tumortransplantation narkotisiert und anschließend zentrisch unter dem trichterförmigen Bestrahlungstubus angeordnet (siehe Abbildung 7, S. 24).

Die Bestrahlung erfolgte nach zwei Schemata mit einer Gesamtdosis von 36 Gy.

In Schema A erfolgte die Applikation in 12 Einzeldosen zu 3 Gy täglich über 2¹/₂ Wochen mit Ausnahme der Wochenenden (Samstag/ Sonntag).

In Schema B wurden 6 Einzeldosen zu 6 Gy jeweils am Montag und Donnerstag innerhalb von 3 Wochen appliziert. So konnte gewährleistet werden, dass alle Versuchstiere die gleiche Gesamtwochendosis erhielten und nach Erreichen einer vergleichbaren Dosis, zu gleichen Zeitpunkten, der Messung des spezifischen Tumorumens und Sauerstoffpartialdruckes im Tumorgewebe zugeführt werden konnten. Somit war ein direkter Vergleich zwischen den Gruppen mit unterschiedlichen Fraktionierungsschemata und Einzeldosen möglich (Tabelle 4, S. 37).

	1. Woche							2. Woche							3. Woche							
Schema	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So	
A	↯	↯	↯	↯	↯			↯	↯	↯	↯	↯			↯	↯						
B	↯			↯				↯			↯				↯			↯				

Tabelle 2: Bestrahlungsschemata; in den 3 Bestrahlungswochen wurden im Schema A jeweils an den Wochentagen Montag-Freitag Photonen in Einzeldosen zu je 3 Gy appliziert. Im Schema B wurde an den Wochentagen Montag und Donnerstag Photonen in Einzeldosen von 6 Gy appliziert.

4.4 Strahlenapplikation am Reaktor/Garching

Die Bestrahlung der murinen Tumore mit Reaktorspaltneutronen am Leichtwasserreaktor der TU München in Garching erfolgte nach einigen Vorversuchen, basierend auf den Ergebnissen der Habilitationsschrift von Ries (Ries 1985, S. 21) und den Versuchen bezüglich Strahlenschäden bei fraktionierter Neutronenbestrahlung an Ratten (Breitner 1986, S. 1031-1034). Die Dosimetrie erfolgte durch die physikalische Abteilung der Klinik für Strahlentherapie des Klinikums Rechts der Isar, München.

Die Bestrahlung der Tumore am Reaktor mit Hilfe des Kollimators, wie oben beschrieben (Abb. 8, S. 25), konnte erst nach Anfertigung einer Positionierungseinrichtung aus Plexiglas mit 4 Modulen, welche mittels Feststellschrauben auf der Basisplatte zu fixieren waren, durchgeführt werden. Das Basismodul konnte in das Kollimatorrohr eingeschoben werden. Tangential zur austretenden Strahlung wurden die in Vierkantröhren fixierten Mäuse (4 Stück) ausgerichtet, wobei der tumortragende Teil im Strahlengang zu liegen kam, der übrige Körper der Maus außerhalb. Die Maus war in der Halterung fixiert, der Tumor durch eine zur Mitte gelegene Schlitzung mit einer Öffnung von 5 mm. Mit dieser Versuchsanordnung konnte eine weitgehend

homogene Tiefendosisverteilung im Tumorgewebe und eine deutliche Reduktion der Strahlenbelastung des gesunden Gewebes gewährleistet werden.

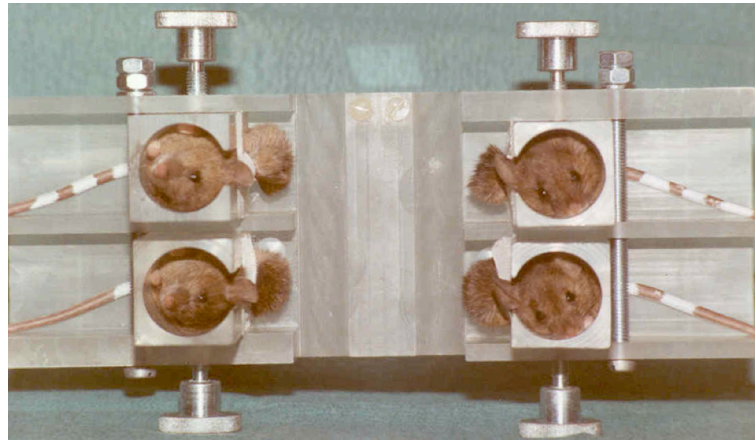


Abbildung 9: Vier, farblich durch Streifen am Schwanz markierte, C3H-Mäuse in der Halterung zur Bestrahlung mit Neutronen am Strahlrohr des FRM

Ausgehend von einer Photonengesamtdosis der von insgesamt 36 Gy, unter der eine signifikante Wachstumsverzögerung des bestrahlten Tumors sowohl unter 12 x 3 Gy wie auch unter 6 x 6 Gy erreicht wurde, und ausgehend von einem RBE von 3 am RENT I des Reaktors in Garching, basierend auf den früher gewonnenen strahlenbiologischen Daten für eine fraktionierte Therapie (Breitner 1986, Ries 1985), wurde eine Gesamtdosis von 12 Gy-Neutronen fraktioniert in Einzeldosen von 6 x 2 Gy appliziert.

	1. Woche							2. Woche							3. Woche						
Schema	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So
C	↔			↔				↔			↔				↔			↔			

Tabelle 3: Bestrahlungsschema C für die fraktionierte Neutronenbestrahlung am Reaktor Garching über einen Zeitraum von 3 Wochen.

4.5 Messanordnung

4.5.1 Aufbau der Messanordnung

Auf einer Arbeitsfläche wurde mittig ein Balsaholzstück (Kantenlänge: 20 x 12 x 8 cm) mit einer aufgeklebten Oberflächenbeschichtung aus 8 mm starkem PU-Schaum

platziert. Zur weiteren Konstanthaltung der Körpertemperatur erfolgte eine kontinuierliche Wärmeapplikation mittels temperaturgesteuerter Infrarotlampe (siehe Kapitel 3.2.4, S. 27).

Vor Beginn der eigentlichen pO_2 -Messung wurde die zu messende Maus mittels einer Lösung von 2 mg Ketamin mit 0,23 mg Xylacin entsprechend eines Gesamtvolumens von 0,2 ml intraperitoneal narkotisiert. Anschließend erfolgte eine Enthaarung des Abdomens mittels eines Einmalrasierers. Dies diente, dazu die Oberflächenspannung der auf der Haut aufgeklebten Gegenelektrode des Eppendorf-Histographen möglichst gering zu halten. Verwendet wurden hierzu EKG- Einmalklebe-Elektroden.

4.5.2 Messung des Sauerstoffpartialdrucks im Tumorgewebe

Aus einem Pool von tumortragenden Tieren wurden 8 Mäuse mit einem Tumolvolumen von $600 \pm 50 \text{ mm}^3$ randomisiert ausgewählt. Jede dieser 8 Mäuse wurde durch eine wasserfeste Markierung mit einem Marker (Firma Edding 400 permanent-weiß) am Schwanz gekennzeichnet. Dadurch war eine Identifizierung jeder einzelnen Maus während des gesamten Experiments gewährleistet.

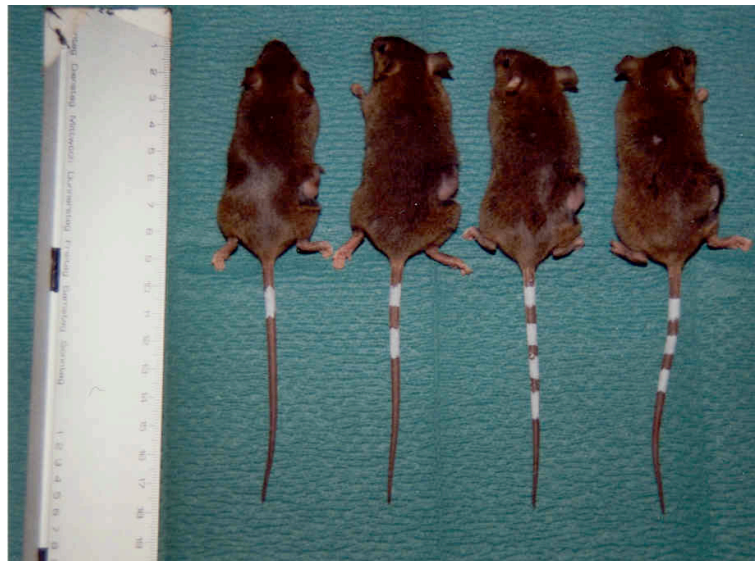


Abbildung 10: Größenverhältnis und Kennzeichnung der Mäuse zur Wiedererkennung der einzelnen Maus während des gesamten Versuchs; Tumor in der rechte Flanke sichtbar.

Die pO_2 -Messung im Tumorgewebe erfolgte teils automatisch durch die mikroprozessorgesteuerte Feinnadelsonde der Firma Eppendorf (Beschreibung Kap. 3.2.3, S. 26, Abb. 11 u. 12). Pro Messung und Tumor wurden zwischen 60 und 200 Messwerte in Abhängigkeit vom Tumolvolumen erhoben. Als Berechnungsgrundlage für die Anzahl der Messwerte galt: 10 Messwerte pro 100 mm^3 . Die Anordnung der Messkanäle entsprach einem vordefinierten Schema: Es erfolgte eine radiäre Anordnung in der Transversalebene des Tumors von lateral. Weitere radiäre Messungen wurden in 2 zusätzlichen Ebenen in jeweils 45° zur Ausgangsebene durchgeführt. Nach der Messung wurden die nummerierten Mäuse in die entsprechenden Käfige zurückgesetzt; d.h. an jedem Tier wurden im Verlauf des 7-wöchigen Versuchs (vgl. Tab. 4, S. 36) mehrfach Messungen durchgeführt. Die einzelnen Tiere wurden am Ende des gesamten Versuchs getötet.

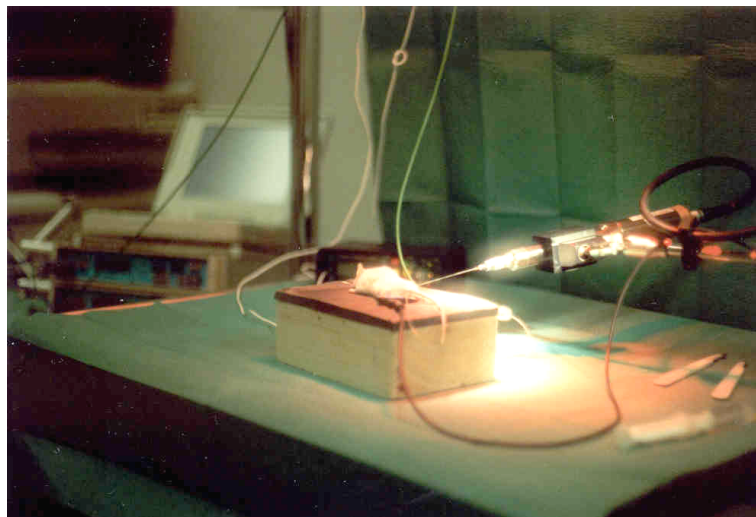


Abbildung 11: Messanordnung und Positionierung einer Maus auf dem Messtisch mit platzierter Messsonde im Tumorgewebe.

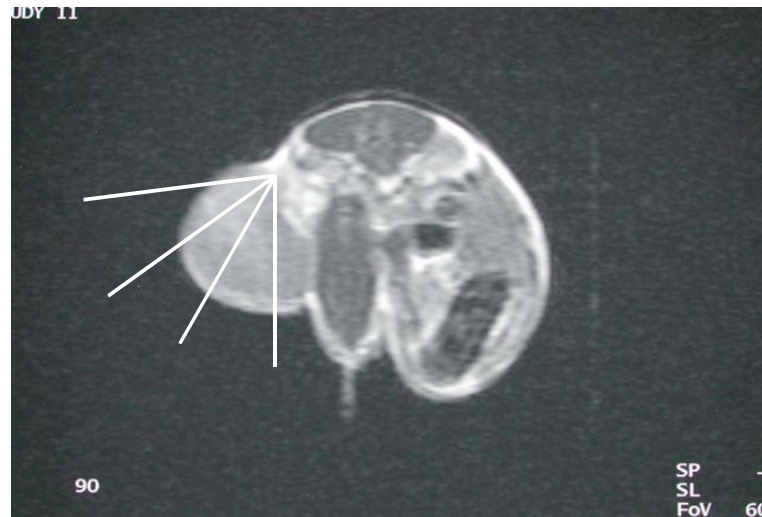


Abbildung 12: Axialer Querschnitt einer tumortragenden balb-C Maus im MRT. Die weißen Markierungen stellen schematisch den Verlauf der Messkanäle der Eppendorf-Sonde durch das Gewebe dar.

4.5.2.1 Erfassung der Daten und graphische Darstellung

Die erfassten pO_2 -Einzelwerte eines Tumors wurden mittels Eppendorf-Histogramm in einer graphischen und numerischen Form dokumentiert. Die graphische Darstellung bestand aus einem Säulendiagramm, in dem die lokalen pO_2 -Werte in Klassen nach deren relativen Häufigkeit geordnet waren. Die x-Achse beschrieb den Gewebesauerstoffpartialdruck in 2,5 mmHg-Schritten (Klassenbreite) bis zu einem Maximalwert von 100 mmHg. Auf der y-Achse wurde die Häufigkeit der Messwerte in der Klassenbreite von 2,5 mmHg in % dargestellt. Als zusätzliche Information wurden die Zahlenwerte der 10 %-, 50 %- (= Median) und 90 %-Perzentile sowie der Mittelwert errechnet und ausgewiesen. Die Anzahl der Messwerte wurde mitprotokolliert. Der Mittelwert beschrieb das arithmetische Mittel aller pO_2 -Werte. Die 10 %-Perzentile eignete sich zur einfachen zahlenmäßigen Erfassung des Anteils niedriger pO_2 -Werte im Histogramm, die 50 %-Perzentile entspricht dem Median, die 90 %-Perzentile gibt den Anteil hoher pO_2 -Werte im Histogramm wieder.

Ein weiteres wichtiges charakteristisches Merkmal des Histogramms stellte die Breite der pO_2 -Verteilung dar: Anhand dieser konnte eine Abschätzung über die Homogenität der pO_2 -Verteilung getroffen werden.

Eine Verarbeitung der Daten erfolgte mit Hilfe des pO_2 -pool-Programms der Firma Eppendorf (Version 1.2). Das Programm konvertierte Daten, die am Histogrammen im CP/M-Format gewonnen wurden, in MS-ACCESS-Datensätze, was ein Einlesen mit einer Windows-Benutzeroberfläche möglich machte.

Mit Hilfe dieses Programms war es möglich, einzelne Histogramme zur graphischen Aufarbeitung, entsprechend der Versuchsanordnung, zu selektieren und dann zu „poolen“, wobei darunter eine gemeinsame Berechnung und graphische Darstellung der individuell erstellten Histogramme zu verstehen ist. Des Weiteren konnten negative Messwerte in einem Bereich von – 1,5 bis 0 mmHg, welche durch die Messgenauigkeit von etwa 1 mmHg im Histogramm im Negativbereich zur Darstellung gekommen waren, graphisch auf dem positiven Anteil der x-Achse übertragen werden. Dabei blieben die errechneten Parameter unverändert. Einzelne Messwerte, welche eindeutig auf Messartefakten zurückzuführen waren, konnten ausgeschlossen werden.

4.5.3 Messung des Volumens

Die Bestimmung des Tumorzvolumens erfolgte mittels einer Schublehre nach 3 orthogonal gelegenen Diametern a, b und c. Die Abschätzung des Tumorzvolumens erfolgte dann nach der Formel:

$$V_{\text{ellipsoid}} = \pi/6 \times (a \times b \times c)$$

Das Tumorzvolumen der Versuchstiere wurde jeweils eine Woche vor Beginn des Bestrahlungszyklus und am Tag der ersten Bestrahlung gemessen. Weitere Volumenverlaufsmessungen erfolgten in 7-tägigen Abständen immer freitags bis maximal 3 Wochen nach Bestrahlungsende. Die Tumoren der Kontrollgruppen (unbestrahlte Tiere) wurden parallel zum Bestrahlungszyklus bis zum Erreichen eines Tumorzvolumens von maximal 5.000 mm³ gemessen.

Zusammenfassende Darstellung des Messaufbaus

	-7	t ₀	1. Woche							2. Woche							3. Woche							
Schema			Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So	
A	V _m	V _m O _m					V _m O _m							V _m O _m							V _m O _m			
B = C	V _m	V _m O _m	⚡				V _m O _m			⚡				V _m O _m			⚡				V _m O _m			

		4. Woche							5. Woche							6. Woche (Kontrollgruppe)							
Schema		Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So	
A						V _m O _m							V _m O _m							V _m O _m			
B = C						V _m O _m							V _m O _m							V _m O _m			

Tabelle 4: Kalendarische Übersicht über die zeitliche Abfolge der Bestrahlungs- und Messtage des Volumens (V_m) und des Sauerstoffpartialdrucks (O_m). Das Schema **A** ist der Versuchsarm mit 12x3 Gy Photonen; Schema **B** beschreibt den Arm mit 6x6 Photonen (Unterschied zu **A** das Fraktionierungsschema und Einzeldosis); Schema **C** entspricht der Neutronengruppe (ist mit Schema **B** in einer Zeile, da sich am zeitlichen Bezug der Bestrahlungs- und Messtage keine Unterschiede ergeben). Die Tage, an denen eine Bestrahlung durchgeführt wurde, sind mit (⚡) gekennzeichnet. -7 beschreibt die erste Woche vor Beginn des eigentlichen Versuchs, als das erforderliche Tumervolumen erreicht wurde. t_0 beschreibt den Zeitpunkt der ersten Messung des Volumens und des pO_2 (siehe Kapitel 4.3 und 4.4). Diese zeitliche Abfolge wurde für jede Maus, unabhängig von der verwendeten Tumorart, von Anfang bis zum Ende des Versuches durchlaufen (Ausnahmen waren Tiere, die für eine histologische Aufarbeitung verwendet wurden).

5 Ergebnisse

5.1 Osteosarkom

5.1.1 Änderung des Volumens im Tumorgewebe

Im ersten Versuchsabschnitt wurde der Einfluss der unterschiedlichen Fraktionierungsschemata und verwendeten Strahlenqualitäten auf das Wachstumsverhalten des murinen Osteosarkoms untersucht. Verwendet wurden die unter 3.1 beschriebenen Tiere, Tumoren und Methoden zur Anzucht von vergleichbaren in-vivo Tumormodellen. Für den Versuch wurden ausschließlich Tumoren mit einem Volumen von $(600 \pm 50) \text{ mm}^3$ zum definierten Zeitpunkt t_0 herangezogen.

5.1.1.1 Änderung des Volumens in der Kontrollgruppe

Die Abbildung 13 (S. 38) zeigt das spontane Wachstumsverhalten der 6 unbehandelten Osteosarkome in der Kontrollgruppe. Alle Tiere wurden über einen Zeitraum von 5 Wochen beobachtet und zeigen ein vergleichbares Tumorstadiumsverhalten. In der ersten Woche t_0 - t_1 konnte eine Tumorstadiumsverdoppelungszeit von durchschnittlich 7 Tagen bis zum Erreichen eines mittleren Tumorstadiumsvolumens von 1.126 mm^3 festgestellt werden; im Zeitraum zwischen t_1 und t_3 eine Verdoppelungszeit innerhalb von 8 - 9 Tagen, entsprechend einem durchschnittlichen Volumen von $1.126 - 3.272,5 \text{ mm}^3$, zwischen t_3 und t_4 , entsprechend dem Volumen $3.272,5 - 4.572,5 \text{ mm}^3$ von 9 – 10 Tagen. Zur Gewinnung einer Histologie wurde die Maus 6 zum Zeitpunkt t_0 , eine Woche nach Versuchsbeginn, bei einem erreichten Tumorstadiumsvolumen von 290 mm^3 getötet; die Maus 5 zum Zeitpunkt t_2 bei einem erreichten Volumen von 1070 mm^3 .

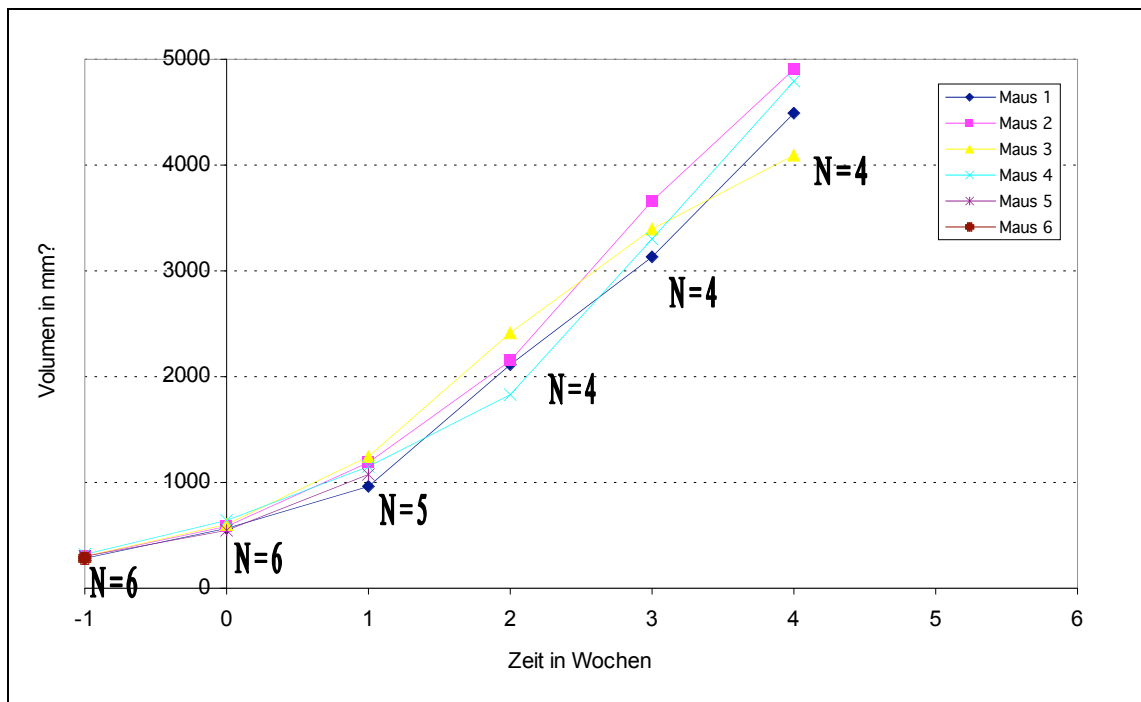


Abbildung 13: Wachstumsverhalten der *Kontrollgruppe*, welche nicht bestrahlt wurde. Es ist ein zunehmendes Tumorwachstum über den gesamten Versuch zu beobachten; daraus ergibt sich eine rechnerische Tumorverdoppelungszeit von durchschnittlich 9 Tagen über den gesamten Beobachtungszeitraum. Jede Maus wurde individuell markiert und fortlaufend vermessen und lässt sich über den Zeitraum verfolgen. **N** beschreibt die Anzahl der zum jeweiligen Messzeitpunkt vorhandenen Mäuse; nach der 4. Woche wurde der Versuch eingestellt, da das Tumolvolumen mehr als 1/4 der Körpergröße der Maus betrug.

5.1.1.2 Änderung des Volumens unter fraktionierter Bestrahlung

Aus der Abbildung 14 (S. 41) wird das Tumorwachstumsverhalten unter fraktionierte Bestrahlung mit 6x2 Gy Neutronen- (Gruppe 1), 6x6 Gy Photonen- (Gruppe 2) und in der 12x3 Gy Photonen- (Gruppe 3) dargestellt. Zusammenfassend lässt sich daraus entnehmen, dass unter den unterschiedlichen Fraktionierungsschemata unterschiedliche Wachstumsverzögerungen entstehen. Im Vergleich der Gruppen zueinander sind vier Merkmale wesentlich:

1. Die Wachstumsverzögerung unter Bestrahlung mit 12 x 3 Gy Photonen setzt später ein.
2. Sie ist unter Bestrahlung mit 12 x 3 Gy nicht so deutlich ausgeprägt, was aus der geringeren Tumorregression und des erreichten Minimalvolumens ersichtlich ist.
3. Die Tumor-Verdoppelungszeit der Gruppe 3, die mit 12 x 3 Gy bestrahlt wurde, erreicht zum Zeitpunkt t_5 annähernd die Werte der Kontroll-Gruppe

ohne Bestrahlung und setzt somit im Vergleich mit der Gruppe 2, mit 6 x 6 Gy bestrahlt, ca. 1 Woche früher ein, wobei diese Gruppe erst zum Zeitpunkt t_6 ein vergleichbares Wachstumsverhalten mit der Kontrollgruppe erreicht.

4. Die mit Neutronen bestrahlte Gruppe 1 erzielt als einzige eine anhaltende Wachstumsverzögerung und keiner der Tumoren dieser Gruppe erreicht am Ende sein Ausgangsvolumen vor Versuchsbeginn.

Im Einzelnen verhalten sich die Gruppen wie folgt. In der Gruppe 1, welche den mit 6 x 2 Gy Neutronen bestrahlten Tieren entspricht, erfolgte eine Einschleusung bei einem mittleren Volumen von $304,4 \text{ mm}^3$ eine Woche vor dem eigentlichen Bestrahlungsbeginn. Entsprechend der in der Kontrollgruppe ermittelten Tumorverdoppelungszeit von 9 Tagen erreichten die ausgewählten acht Tumoren zum Zeitpunkt t_0 eine mittlere Größe von ca. $591,3 \text{ mm}^3$. Nach einer Woche Bestrahlung mit 2 x 2 Gy Neutronen, entsprechend einer Äquivalenzdosis von 12 Gy Photonen, erreichen die Versuchstiere ein mittleres Volumen von $616,3 \text{ mm}^3$. Ab diesem Zeitpunkt kam es zu einer deutlichen Wachstumsregression bis zum Ende des Bestrahlungszyklus, wobei der Tiefpunkt des mittleren Volumens in der 4. Woche nach Bestrahlungsbeginn (t_4), entsprechend der 2. Woche nach Beendigung der Neutronen-Bestrahlung erreicht wurde, mit einem mittleren Volumen von 366 mm^3 bei fünf Tieren ($N_{t_4} = 5$). Die Wachstumsverzögerung hielt bis zur 5. Woche (t_5) an. Anschließend nahm das mittlere Tumorumfang wieder langsam zu, aber weiterhin mit einer anhaltenden Verzögerung und einer interpolierten Tumor-Verdoppelungszeit von ca. 7 Wochen. Keiner der im Verlauf beobachteten Tumoren erreichte bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes sein Ausgangsvolumen zum Zeitpunkt t_0 . Zwei der Tumoren erfuhren unter Radiatio eine Komplettremission und waren auch zum Ende der Versuchs nicht mehr nachweisbar. Diese beiden Komplettremissionen wurden in die Kalkulation des mittleren Volumens mit einbezogen.

In der Gruppe 2, die mit 6x6 Gy Photonen bestrahlt wurde, wurden zum Startzeitpunkt t_1 ebenfalls acht Tiere, mit einem mittleren Volumen von $301,3 \text{ mm}^3$ in den Versuch eingeschleust. Diese erreichten nach einer Woche ein erwartetes mittleres Tumorumfang von durchschnittlich $597,5 \text{ mm}^3$. Ähnlich den Beobachtungen in der Gruppe 1 stellte sich auch in der Gruppe 2 eine Wachstumsverzögerung innerhalb der 1. Bestrahlungswoche ein, wobei ein durchschnittliches Maximalvolumen zum Zeitpunkt t_1 von 700 mm^3 erreicht wurde. 1 ½ Wochen nach Bestrahlungsbeginn kam es zu einer Volumenreduktion, die über den gesamten Bestrahlungszeitraum und darüber hinaus bis zu zwei Wochen nach Beendigung der Therapie anhielt. Zum Zeitpunkt t_4 wurde das geringste mittlere Volumen mit 400 mm^3 erreicht. Ab der 5. Woche stieg die Wachstumskurve wieder an, mit einem mittleren Volumen von 476 mm^3 bei 5 Tieren

zum Zeitpunkt t_5 und von 796 mm^3 zum Zeitpunkt t_6 . Bis zu diesem Zeitpunkt t_5 war das Wachstumsverhalten der Gruppe 2 sehr ähnlich zur Gruppe 1 (siehe Abb. 14, S. 41). Ab der 5. Woche differierten die Wachstumskurven, wobei in der Gruppe 2 ein Anstieg des Volumens mit 476 mm^3 bei 5 Tieren versus 384 mm^3 bei 5 Tieren in der Gruppe 1 zu verzeichnen war. Zum Zeitpunkt t_6 erreichte die Gruppe 2 ein Durchschnittsvolumen von 796 mm^3 bei 5 Tieren versus 465 mm^3 bei 4 Tieren in der Gruppe 1. In der Gruppe 2 war somit das Ausgangsvolumen zum Zeitpunkt t_0 ($597,5 \text{ mm}^3$) in der 6. Woche entsprechend t_6 ($V = 796 \text{ mm}^3$) überschritten. Die Gruppe 1 zeigte zum Zeitpunkt t_6 eine anhaltende Wachstumsverzögerung mit einem mittleren Volumen von 465 mm^3 und lagt damit immer noch unter dem Ausgangswert (V zum Zeitpunkt $t_0 = 591,3 \text{ mm}^3$). In der Gruppe 2 erreichten wir somit zum Zeitpunkt t_6 eine Tumorverdoppelungszeit von ca. 9 Tagen, was dem Wachstumsverhalten der unbestrahlten Kontroll-Gruppe entsprach (siehe Abb. 13, S. 38 und Abb. 14, S. 41)

In der Gruppe 3, entspricht den Tieren, die mit $12 \times 3 \text{ Gy}$ Photonen bestrahlt wurden, beobachteten wir zum Zeitpunkt t_1 bei 8 Tieren ein mittleres Volumen von $297,5 \text{ mm}^3$, zum Zeitpunkt t_0 ein mittleres Volumen von $566,3 \text{ mm}^3$ bei 8 Tieren. Innerhalb der 1. Bestrahlungswoche verlangsamte sich das Wachstum der Tumoren mit einem mittleren Volumen von durchschnittlich 804 mm^3 bei 8 Tieren, im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 1.126 mm^3 zum Zeitpunkt t_1 , nahm aber dennoch kontinuierlich bis zum 9. Tag nach Bestrahlungsbeginn zu, um dann in eine Regression überzugehen ($V_m = 747,1 \text{ mm}^3$ zum Zeitpunkt t_2), welche aber im Vergleich geringer ausgeprägt war als in Gruppe 1 ($V_m = 552 \text{ mm}^3$ zum Zeitpunkt t_2) und Gruppe 2 ($V_m = 627,1 \text{ mm}^3$ zum Zeitpunkt t_2). Die Wachstumsverzögerung setzte sich bis zur 4. Woche fort, entsprechend t_4 , um ein mittleres Minimalvolumen von $643,3 \text{ mm}^3$ zu diesem Zeitpunkt zu erreichen. Zum Zeitpunkt t_5 hatte sich das Volumen ($V_m = 935 \text{ mm}^3$ bei $N = 6$ Tieren) im Vergleich zum Zeitpunkt t_4 ($V_m = 643,3 \text{ mm}^3$ bei $N = 6$ Tieren), also innerhalb einer Woche, annähernd verdoppelt und zum Ende des Beobachtungszeitraumes t_6 erreichten wir das dreifache Volumen ($V_m = 1.776,7 \text{ mm}^3$ bei $N = 6$ Tieren) des Ausgangswertes ($V_m = 566,3 \text{ mm}^3$ bei $N = 8$ Tieren). Hieraus lässt sich errechnen, dass zum Zeitpunkt t_5 , entsprechend $2 \frac{1}{2}$ Wochen nach Bestrahlungsende, erneut eine Tumorverdoppelungszeit von ca. 9 Tagen erreicht wird, vergleichbar der unbestrahlten Kontrollgruppe, um im weiteren Verlauf ungebremst anzuhalten.

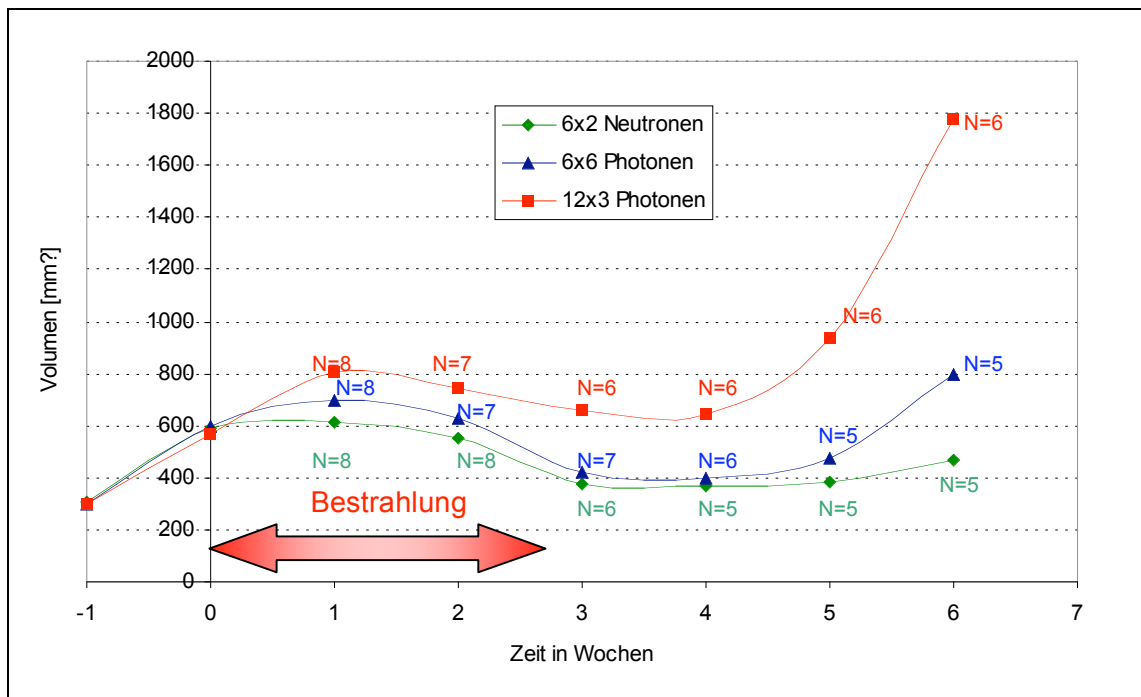


Abbildung 14: Änderung des Tumorzvolumens über einen Zeitraum von 7 Wochen, in den drei verschiedenen Bestrahlungsarmen.

- Neutronenbestrahlung mit Einzeldosen zu 2Gy (grüne Raute)
- Photonenbestrahlung mit Einzeldosen zu 6 Gy (blaues Dreieck)
- Photonenbestrahlung mit Einzeldosen zu 3 Gy (rotes Viereck)

Es ergab sich für alle drei Arme eine deutliche Wachstumsverzögerungskurve mit Schulterbildung ab der 2. Bestrahlungswoche. Die Gruppe 1, entsprechend der mit 6x2Gy Neutronen bestrahlten Tiere und die Gruppe 2, entsprechend der mit 6x6 Gy Photonen bestrahlten Tiere, verhielten sich annähernd parallel. In der Gruppe 3, entsprechend der mit 12x3 Gy Photonen bestrahlten Tiere, erreichten wir auch eine Wachstumsverzögerung, wobei ab der 4. Woche das Wachstum rasant anstieg, um gegen Ende des Versuchs eine Tumorverdoppelungszeit zu erreichen, die derjenigen der Kontrollgruppe vergleichbar ist (siehe Abb.13, S. 38).

N beschreibt die Anzahl der beobachteten Mäuse zum entsprechenden Zeitpunkt.

5.1.2 Änderung des Sauerstoffpartialdrucks im Tumorgewebe

Der zweite Versuch untersuchte den intratumoralen pO_2 in Abhängigkeit von den verschiedenen Bestrahlungsmodalitäten. Die pO_2 -Messung der Tumoren erfolgte gemäß den im Versuchsaufbau festgelegten Zeitpunkten t_0 - t_5 (siehe Tabelle 4, S. 36). Die Tiere wurden entsprechend ihrer farblichen Markierung, der im Kapitel 4.5 beschriebenen Messanordnung, mittels einer Feinnadelmesssonde der Firma Eppendorf gemessen. Die Anzahl der Messpunkte wurde in Abhängigkeit vom Tumolvolumen des einzelnen Tumors zum jeweiligen Zeitpunkt festgesetzt (siehe 4.5.2).

5.1.2.1 Änderung des Sauerstoffpartialdrucks in der Kontrollgruppe

Zusammenfassend lässt sich aus dem Kurvenverlauf der Abbildung 15 (S. 43) erkennen, dass bei den unbestrahlten Osteosarkomen ein kontinuierlicher Abfall des mittleren pO_2 in den ersten drei Wochen stattfand, um zum Zeitpunkt t_3 ein Minimum von 6 mmHg zu erreichen. In der letzten Woche t_4 kommt es zu einem geringfügigen pO_2 -Anstieg. Im Detail wurde mit der Messung des Sauerstoffpartialdrucks zum Zeitpunkt t_0 bei einer Anzahl von 6 Tieren begonnen. Dabei ergab sich ein mittlerer pO_2 von 19,2 mmHg bei insgesamt 285 Messpunkten aller 6 Tiere. Die Maus 6 wurde nach der Messung abgetötet und zur histologischen Aufbereitung weitergeleitet. Nach einer Woche, also zum Zeitpunkt t_1 , ergab sich bei den verbliebenen 5 Tieren ein mittlere pO_2 von 13,6 mmHg, ermittelt aus 501 Messpunkten; somit war ein steiler Abfall des pO_2 innerhalb der ersten Woche eingetreten. Bis zum Ende der dritten Woche setzte sich dieser Abfall fort, wobei sich zum Zeitpunkt t_2 der mittlere pO_2 (pO_2 zum Zeitpunkt t_2 : 11,5 mmHg bei $n = 578$ Messpunkten) gegenüber dem Ausgangswert (pO_2 zum Zeitpunkt t_0 : 19,2 mmHg bei $n = 285$ Messpunkten) annähernd halbierte und in der dritten Woche weiter auf ca. $\frac{1}{4}$ (pO_2 zum Zeitpunkt t_3 : 5,1 mmHg bei $n = 795$ Messpunkten) des Ausgangswertes abfiel. Zu diesem Zeitpunkt erreichte der mittlere pO_2 seinen Tiefpunkt über den gesamten Beobachtungszeitraum. In der 4. Woche (t_4) kam es zu einem geringfügigen Anstieg (pO_2 zum Zeitpunkt t_4 : 8,0 mmHg bei $n = 788$ Messpunkten).

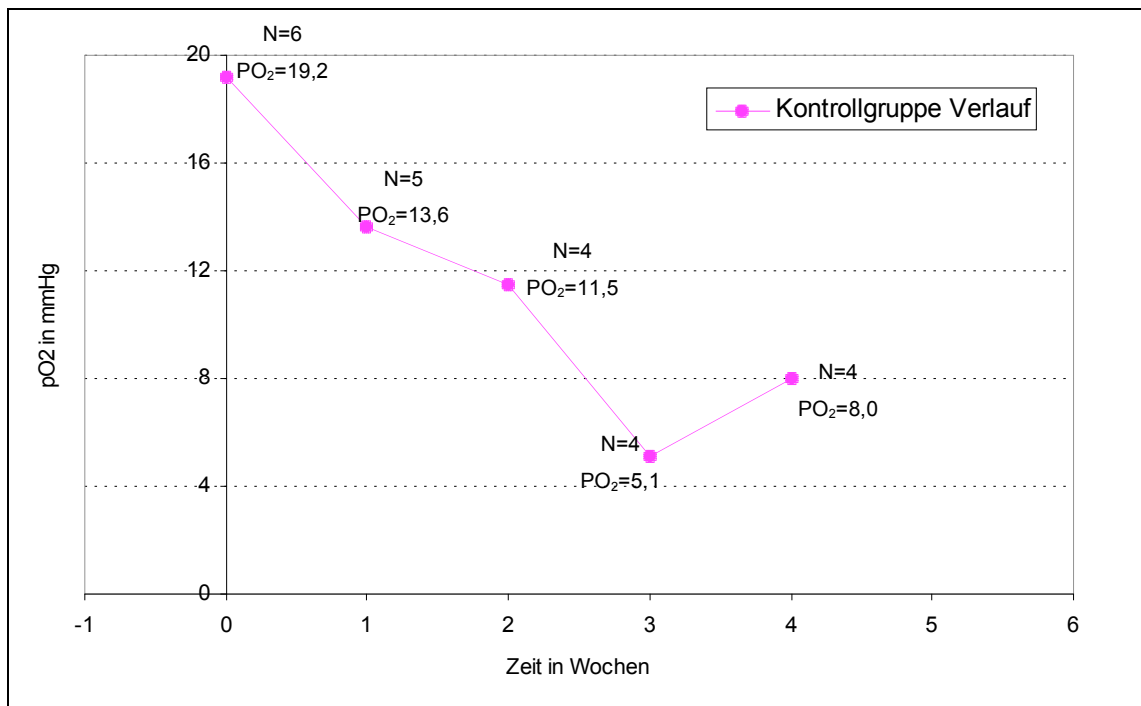


Abbildung 15: Der mittlere Sauerstoffpartialdruck der *Kontrollgruppe* wurde über einen Zeitraum von 4 Wochen gemessen. Deutlich ist ein kontinuierlicher Abfall des pO_2 -Wertes bis zur 3. Woche erkennbar. In der letzten Woche (t_4) kommt es zu einem geringfügigen Anstieg, welcher auch im Rahmen von statistischen Schwankungen, bedingt durch Messungenauigkeiten, liegen könnte. N = Anzahl der gemessenen Osteosarkome; pO_2 = mittlerer pO_2 zum jeweiligen Messzeitpunkt als Mittelwert der mittleren pO_2 -Werte aller gemessenen Tiere.

5.1.2.2 Änderung des Sauerstoffpartialdrucks unter fraktionierter Bestrahlung

In der Abbildung 16 (S.45) wird die Änderung des Sauerstoffpartialdrucks in den drei bestrahlten Osteosarkom-Gruppen vergleichend dargestellt. Es zeigt sich, dass die Gruppen 2 und 3, die mit Photonen bestrahlt wurden, ein ähnliches Verhalten aufwiesen. Der Abfall des pO_2 beginnt nach der ersten Woche der Bestrahlung. Die ermittelten Kurven der beiden Gruppen 2 und 3 zeigten eine fast identische Steilheit. Im weiteren Verlauf bewegten sich die Kurven parallel, wobei die Gruppe 2 (6x6 Gy Photonen) etwas tiefere Werte erreichte wie die Gruppe 3 (12x3 Gy Photonen). Darüber hinaus wurde in der Gruppe 2 der tiefste ermittelte pO_2 ca. 3 - 4 Tage vor dem der Gruppe 3 erreicht. Im Bezug auf die Reoxygenierung setzte in der Gruppe 2 ein Anstieg des pO_2 zwischen t_3 und t_4 und somit eine Woche früher als in Gruppe 3 ein. Vergleicht man die beiden mit Photonen bestrahlten Gruppen mit der Gruppe, die mit Neutronen bestrahlt wurde, ergeben sich deutliche Unterschiede. Die Steilheit des Kurvenverlaufs war schon zu Beginn der Bestrahlung zum Zeitpunkt t_1 ausgeprägter, der zu diesem Zeitpunkt registrierte pO_2 lag deutlich unter dem der Gruppe 2 und 3

(Gruppe 1: $pO_2 [t_1] = 6,2 \text{ mmHg}$ versus Gruppe 2: $pO_2 [t_1] = 13,0 \text{ mmHg}$ versus Gruppe 3: $pO_2 [t_1] = 13,9 \text{ mmHg}$). Im weiteren Verlauf vergrößerte sich die Differenz zwischen den konventionell bestrahlten Gruppen und der Hoch-LET-Gruppe (Gruppe 1: $pO_2 [t_2] = 0,0 \text{ mmHg}$ versus Gruppe 2: $pO_2 [t_2] = 7,7 \text{ mmHg}$ versus Gruppe 3: $pO_2 [t_2] = 9,6 \text{ mmHg}$). Der tiefste Punkt des registrierten mittleren pO_2 der Gruppe 1 wurde zum Zeitpunkt t_2 , durchschnittlich 1 Woche früher als in der Gruppe 2 und $1 \frac{1}{2}$ Wochen früher als in der Gruppe 3 erreicht.

Mit der Reoxygenierung verhielt es sich ähnlich; sie setzte in der Gruppe 1 (Neutronen) zum Zeitpunkt zwischen t_2 und t_3 ein, in der Gruppe 2 zwischen t_3 und t_4 und in der Gruppe 3 ab t_4 . Ab diesem Zeitpunkt hatten sich alle drei Bestrahlungsgruppen einander angenähert und verliefen, dargestellt in einer Kurvenfunktion über die Zeit, ab dem Zeitpunkt t_4 parallel, um zum Zeitpunkt t_5 annähernd gleiche Werte zu erreichen (Gruppe 1: $pO_2 [t_5] = 19,7 \text{ mmHg}$; Gruppe 2: $pO_2 [t_5] = 9,6 \text{ mmHg}$; Gruppe 3: $pO_2 [t_5] = 18,6 \text{ mmHg}$). Alle drei Gruppen erreichten, unabhängig von der Strahlungsart, zum Ende des Versuchs (Zeitpunkt t_5) vergleichbare mittlere pO_2 -Werte wie zu Beginn des Experiments (vor Bestrahlung zum Zeitpunkt t_0).

In der Gruppe 1 ($6 \times 2 \text{ Gy}$ Neutronen) ergab sich bei 8 Mäusen zum Zeitpunkt t_0 ein mittlerer pO_2 von $17,8 \text{ mmHg}$ ($n = 456$ Messpunkte), was sowohl in der Kontrollgruppe (pO_2 zum Zeitpunkt t_0 : $19,2 \text{ mmHg}$ bei $n = 285$ Messpunkten und $N = 5$ Tieren), in der Gruppe 2 (pO_2 zum Zeitpunkt t_0 : $18,0 \text{ mmHg}$ bei $n = 356$ Messpunkten und $N = 8$ Tieren), und in der Gruppe 3 (pO_2 zum Zeitpunkt t_0 : $19,2 \text{ mmHg}$ bei $n = 448$ Messpunkten und $N = 8$ Tieren) ermittelt wurde.

Nach der ersten Woche der Bestrahlung mit Neutronen (Gesamtdosis von 4 Gy Neutronen zum Zeitpunkt t_1) zeigte sich ein erheblicher Abfall des mittleren pO_2 auf $6,2 \text{ mmHg}$ ($n = 490$ Messpunkte bei $N = 8$ Tieren) der sich unter Bestrahlung bis zum Zeitpunkt t_2 fortsetzte und nach 2 Wochen, bei einer Gesamtdosis von 8 Gy Neutronen, seinen Tiefpunkt erreichte (pO_2 zum Zeitpunkt t_2 : 0 mmHg bei $n = 423$ Messpunkten und $N = 8$ Tieren). Zum Zeitpunkt t_3 , nach abgeschlossener Bestrahlung, stieg der pO_2 im Mittel auf Werte von $3,5 \text{ mmHg}$ ($n = 289$ Messpunkte, $N = 6$ Tiere), zum Zeitpunkt t_4 auf $9,0 \text{ mmHg}$ ($n = 184$ Messpunkte, $N = 5$ Tiere) und zum Zeitpunkt t_5 , zum Ende des Versuchs, auf $19,7 \text{ mmHg}$ ($n = 175$ Messpunkte, $N = 5$ Tiere). Hier wurde wieder der Ausgangswert, der zu Beginn ermittelt wurde, erreicht.

In der Gruppe 2 ($6 \times 6 \text{ Gy}$ Photonen) ergab sich zum Zeitpunkt t_1 ebenso ein Abfall des pO_2 von $18,0 \text{ mmHg}$ zum Zeitpunkt t_0 ($n = 356$ Messpunkte, $N = 8$ Tiere) auf 13 mmHg ($n = 553$ Messpunkte, $N = 8$ Tiere); dieser Abfall setzte sich bis zum Tag 18 fort, wobei zum Zeitpunkt t_2 ein mittlerer pO_2 von $7,7 \text{ mmHg}$ ($n = 450$ Messpunkte, $N = 7$ Tiere), zum Zeitpunkt t_3 von $7,7 \text{ mmHg}$ ($n = 257$ Messpunkte, $N = 7$ Tiere) erreicht wurde. Ab

t_4 beobachteten wir einen geringfügigen Anstieg des pO_2 ($pO_2 [t_4] = 9,5 \text{ mmHg}$, $n = 211$ Messpunkte, $N = 6$ Tiere), welcher sich im Verlauf fortsetzte, um zum Zeitpunkt t_5 Werte von durchschnittlich $19,6 \text{ mmHg}$ ($n = 236$ Messpunkte, $N = 5$ Tiere) zu erreichen.

In der Gruppe 3 ($12 \times 3 \text{ Gy Photonen}$) ergab sich ein ganz ähnlicher Kurvenverlauf. Zum Zeitpunkt t_1 war der mittlere $pO_2 = 13,9 \text{ mmHg}$ ($n = 623$ Messpunkte, $N = 8$ Tiere), zum Zeitpunkt t_2 $pO_2 [t_2]: 9,6 \text{ mmHg}$ ($n = 520$ Messpunkte, $N = 7$ Tiere), zu t_3 $pO_2 [t_3]: 9,7 \text{ mmHg}$ ($n = 365$ Messpunkte, $N = 6$ Tiere) und zu t_4 $pO_2 [t_4]: 9,6 \text{ mmHg}$ ($n = 361$ Messpunkte, $N = 6$ Tiere). Der Tiefpunkt des mittleren pO_2 wurde in dieser Gruppe zum Zeitpunkt t_3 erreicht, das entspricht dem 21. Tag. Ab dem Zeitpunkt t_4 ($pO_2 [t_4]: 9,6 \text{ mmHg}$, $n = 361$ Messpunkte, $N = 6$ Tiere) kam es auch in Gruppe 3 zu einer deutlichen Reoxygenierung der bestrahlten Tumoren ($pO_2 [t_5]: 18,6 \text{ mmHg}$, $n = 760$ Messpunkte, $N = 6$ Tiere).

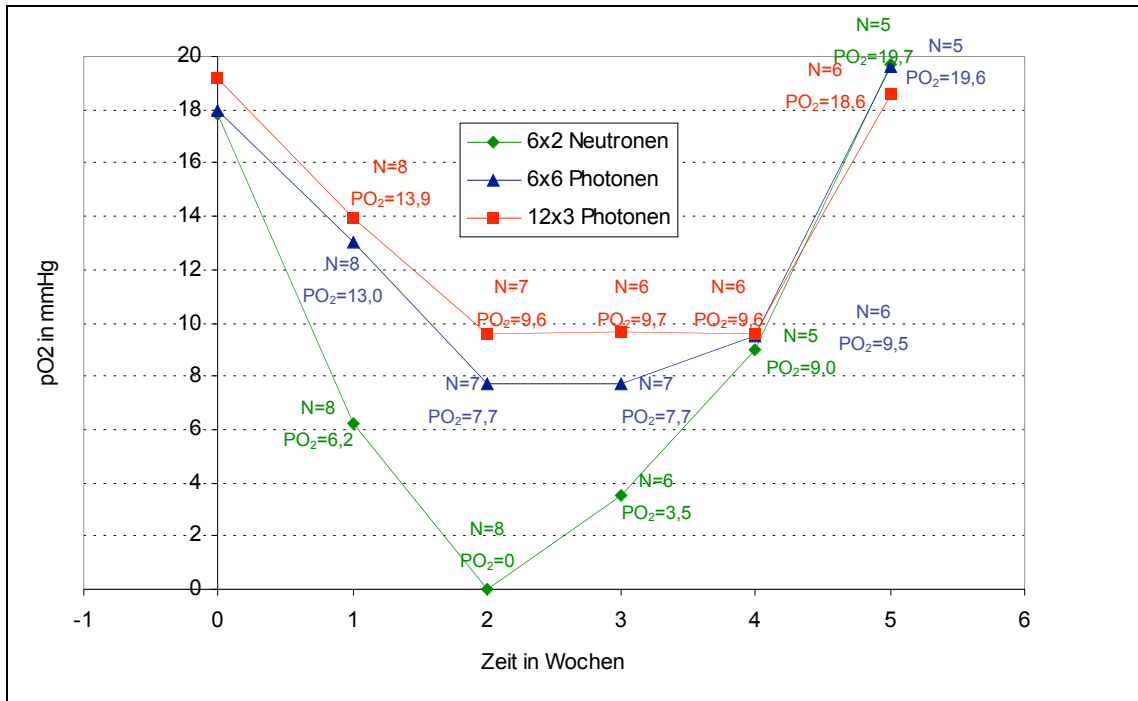


Abbildung 16: Darstellung des pO_2 in mmHg (Abszisse) der drei unterschiedlichen Versuchsgruppen unter fraktionierter Neutronen- und Photonenbestrahlung über die Zeit in Wochen (Horizontale); beginnend vor der 1. Bestrahlung bis zwei Wochen nach Bestrahlungsende. Deutliche Parallelität der Photonengruppen zueinander; dazu ausgeprägter Abfall des mittleren pO_2 bei den Neutronen und früheres Wiedereinsetzen einer Reoxygenierung; N = Anzahl der vermessenen Osteosarkome; pO_2 = mittlerer pO_2 als gepoolter Mittelwert aller gemessenen pO_2 -Werte zum jeweiligen Messzeitpunkt der gemessenen Tiere.

5.1.3 Tumorvolumen in Relation zum pO₂

5.1.3.1 Tumorvolumen in Relation zum pO₂ ohne Bestrahlung

In der Kontrollgruppe beobachtete man, wie unter Kapitel 5.1.1.1 beschrieben, ein steiles Wachstum aller unbestrahlten Osteosarkome über den gesamten Beobachtungszeitraum von 5 Wochen, mit einer mittleren Tumor-Verdoppelungszeit von 7-9 Tagen. Über den gleichen Zeitraum war ein kontinuierlich starker Abfall des mittleren pO₂ festzustellen (siehe Kapitel 5.1.2.1), beginnend von einem mittleren pO₂ von 19,2 mmHg zum Zeitpunkt t₀ (n = 285 Messpunkte; N = 5 Tiere) bei einem durchschnittlichen Tumorvolumen von 590 mm³ bis zu einem mittleren pO₂ von 8,0 mmHg zum Zeitpunkt t₄ (n = 788 Messpunkte; N = 4 Tiere) bei einem durchschnittlichen Volumen von 4.572,5 mm³. Das entspricht einem Abfall um mehr als der Hälfte des Ausgangswertes. Zum Zeitpunkt t₁ nahm der pO₂ indirekt proportional zum ansteigenden Tumorvolumen ab. Ab dem Zeitpunkt t₃ schien ein „kritisches“ Tumorvolumen (V = 3.272,5 mm³) erreicht zu sein. Der zu diesem Zeitpunkt ermittelte mittlere pO₂ (pO₂ [t₃] = 5,1 mmHg) zeigte sich in Folge auch bei weiter anwachsendem Tumorvolumen relativ konstant (siehe Abb. 12 und Abb. 14). In ähnlichen Untersuchungen zum Verhalten des pO₂ in Abhängigkeit vom Tumorvolumen wurden in der Vergangenheit vergleichbare Ergebnisse erhoben (Kallinowski 1989, S. 226-272; Vaupel 1989, 6449-6465; Vaupel 1991, S. 165-185).

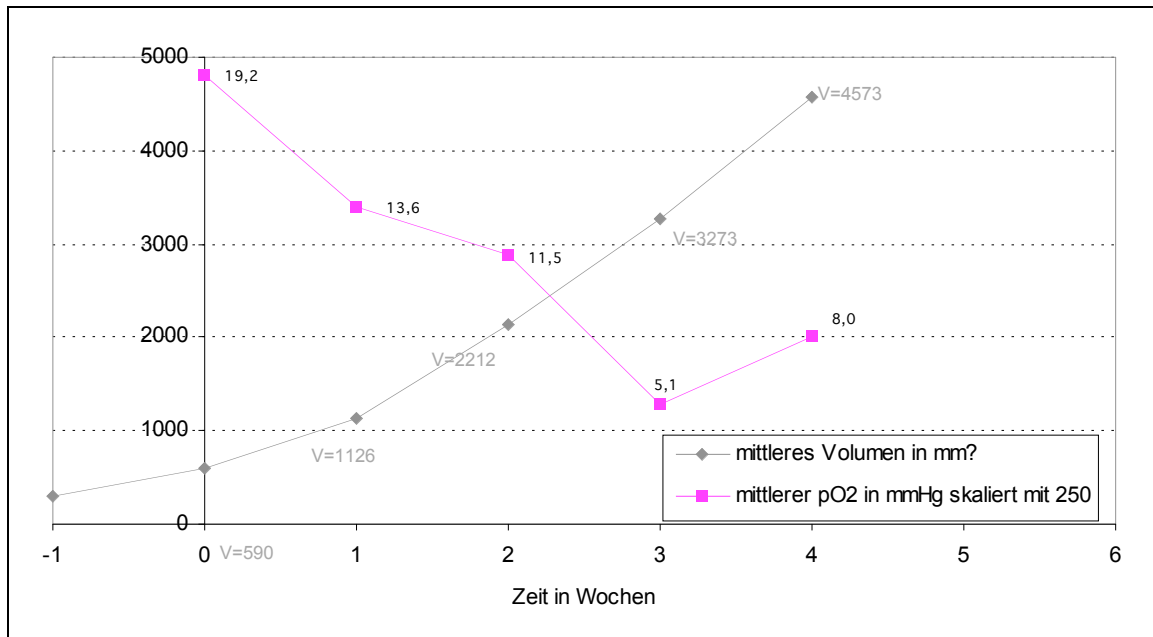


Abbildung 17: Darstellung des mittleren pO₂ in mmHg und des durchschnittlichen Tumolvolumens in mm³ in Relation zueinander. Eine eindeutige Abhängigkeit ist ersichtlich: Mit ansteigendem Volumen kam es zum indirekt proportionalen Abfall des pO₂. Zur Vergleichbarkeit in der Graphik wurde die Abszisse für den pO₂ mit dem Faktor 250 skaliert.

5.1.3.2 Tumolvolumen in Relation zum pO₂ mit Bestrahlung

Die in der unbestrahlten Kontrollgruppe (Kap. 5.1.3.1, Abb. 17, S.46) festgestellte Abhängigkeit der Tumoroxygenierung vom Tumolvolumen ließ sich in den bestrahlten Gruppen (siehe Abb. 18, S.48), unabhängig von der gewählten Einzeldosis oder Strahlungsart nicht nachweisen. Der konstante Faktor im direkten Vergleich der einzelnen Gruppen zueinander ist die Zeit. Aus den gewonnenen Daten ließ sich somit kein Zusammenhang zwischen dem gemessenen Tumolvolumen zu einem bestimmten Zeitpunkt t und dem zum gleichen Zeitpunkt ermittelten pO₂ herstellen. Die Relation zwischen pO₂ und Tumolvolumen ist somit im bestrahlten Tumorgewebe aufgehoben. Alle drei Gruppen erreichten zum Zeitpunkt t_1 ihr maximales Volumen, bevor eine Regression eintrat. Ebenso konnte das geringste Tumolvolumen zum Zeitpunkt t_4 festgestellt werden. Bei der Betrachtung des pO₂ ergaben sich, in Abhängigkeit von der verwendeten Strahlungsart, in bezug auf die Zeit deutliche Unterschiede. Unter HochLET-Strahlung zeigte sich ein Abfall des pO₂ zu einem früheren Zeitpunkt als unter konventioneller Röntgenstrahlung. Der Tiefpunkt der Tumoroxygenierung wurde eine halbe Woche vor der Gruppe 2, unter 6 x 6 Gy Photonen eine ganze Woche vor der Gruppe 3 (12 x 3 Gy Photonen) erreicht. Ebenso setzte die Reoxygenierung zu einem früheren Zeitpunkt ein.

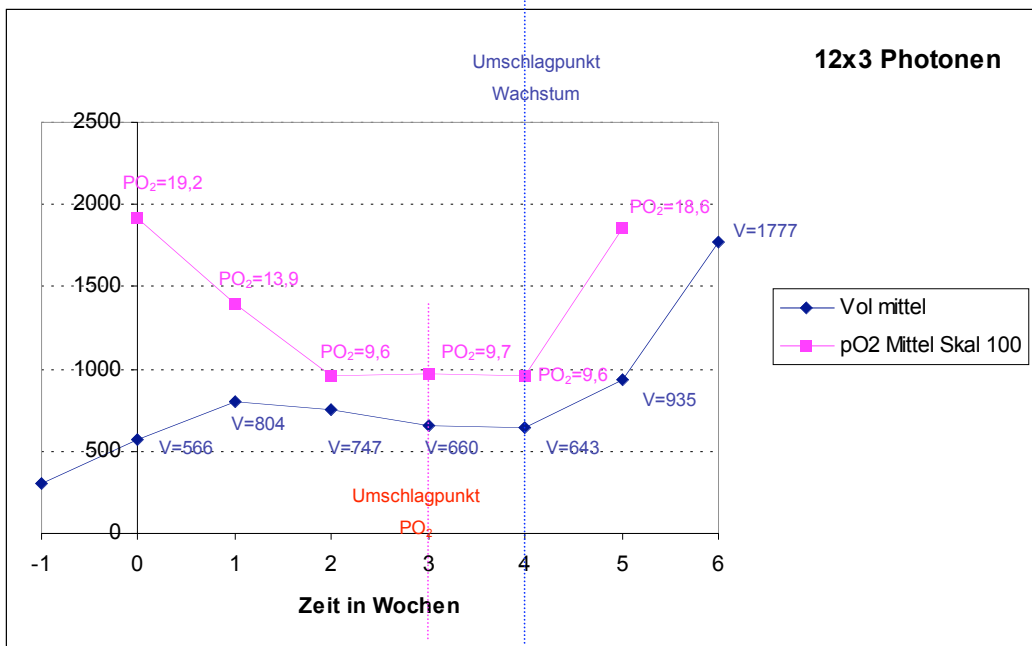
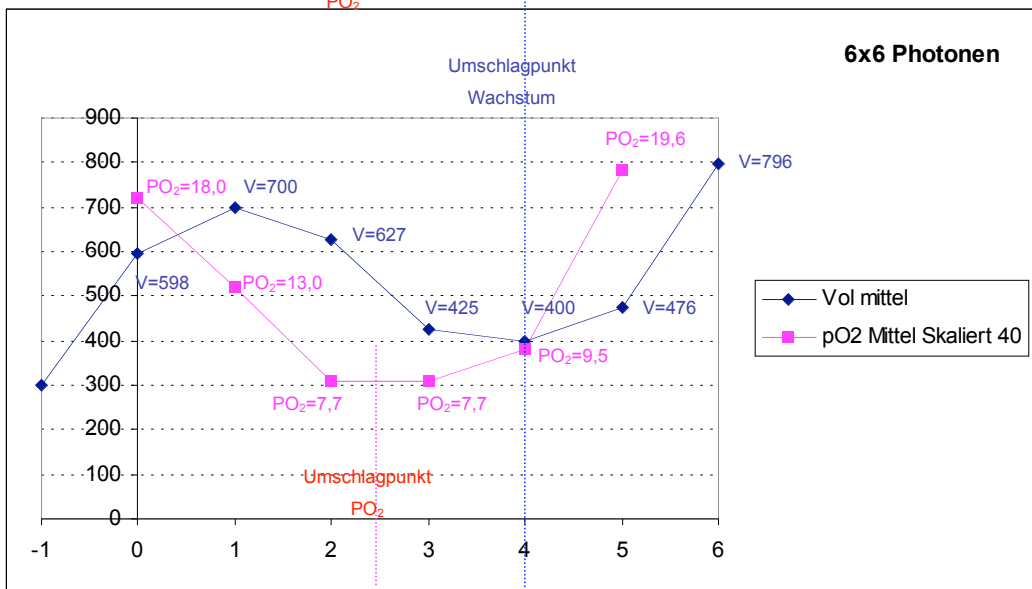
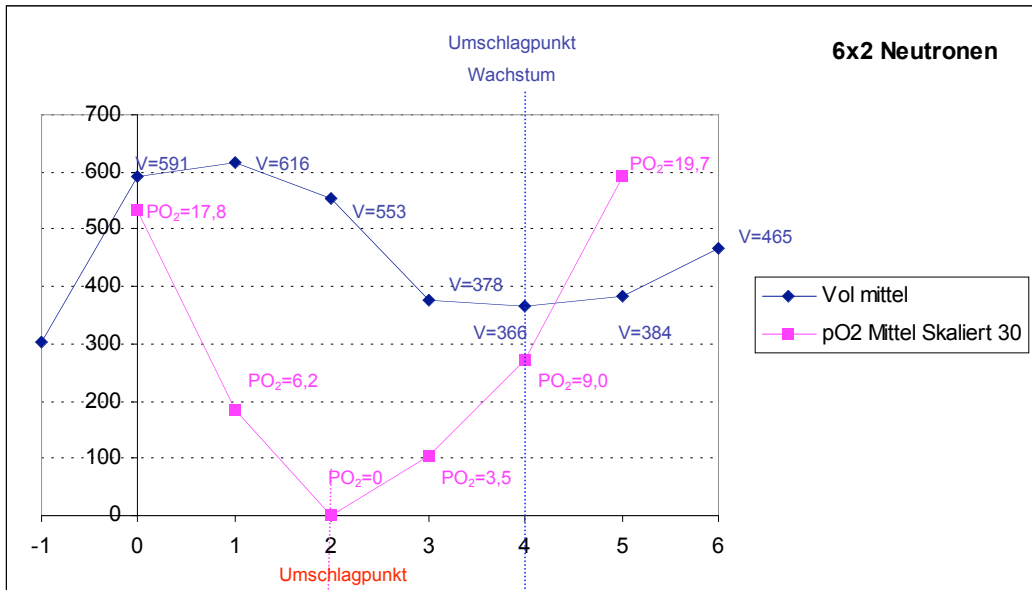


Abbildung 18: Bestimmung der Wendepunkte von Volumen und pO_2 in den bestrahlten Osteosarkomen, Gruppe 1-3: In den bestrahlten Gruppen ist ein gemeinsames Minimum des mittleren Volumens in der 4. Woche zu beobachten, welches durch eine blaue senkrechte Hilfslinie markiert wurde. Um die zeitlich unterschiedlich auftretenden Tiefpunkte des Sauerstoffgehaltes hervorzuheben, wurden in Abhängigkeit von der Bestrahlungsart und Fraktionierung diese Minima durch eine senkrechte rosa Linie markiert. Unter Neutronen Bestrahlung trat dieses Minimum früher auf als bei Photonenbestrahlung mit 6x6 Gy und 12x3 Gy. Eine Relation zwischen Tumolvolumen und Gewebe- pO_2 war unter Bestrahlung nicht zu erkennen.

5.1.4 Prozentuale Verschiebung des pO_2 unter Bestrahlung

5.1.4.1 Verschiebung der prozentualen pO_2 -Verteilung unter high LET-Strahlung (6 x 2 Neutronen)

Abbildung 19 zeigt die gepoolten Histogramme der untersuchten Tumoren unter Bestrahlung mit 6 x 2 Gy Neutronen im wöchentlichen Intervall. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die prozentuale Verteilung des pO_2 unter Neutronenbestrahlung, im Vergleich zu den Ausgangswerten, mit zunehmender Dosis eine Verschiebung nach links, d.h. eine Kumulierung auf den niedrigen Werten erfährt und erst nach Erreichen der Gesamtdosis von 12 Gy, nach einer gewissen Latenz, wieder eine ausgeglichene Verteilung erlangt, vergleichbar mit den unbestrahlten Tumoren. Ähnliche Beobachtungen wurden von Zywietz et al. (Zywietz 1995, S. 1393-1395) in vorangegangenen Experimenten an Rhabdomyosarkomen der Ratte gemacht, wobei in dieser Arbeit keine wesentliche Änderung des mittleren pO_2 unter Bestrahlung auffällig geworden waren, lediglich die Drift der prozentualen pO_2 -Verteilung verhielt sich ähnlich. Zum Zeitpunkt t_0 , d.h. vor der ersten Bestrahlung, zeigte sich bei 8 untersuchten Tumoren und 456 erhobenen Messpunkten eine prozentual relativ gleichmäßige Verteilung der pO_2 -Werte über einen Bereich von 0 – 55 mmHg, wobei der mittlere pO_2 aus allen Werten bei 17,8 mmHg lag und 31 % der pO_2 -Werte unterhalb von 5 mmHg lagen. Nach einer Woche zeigte sich sowohl ein Anstieg des Anteils der Werte < 5 mmHg (42 % bei $N = 8$; $n = 490$) als auch ein Abfall des mittleren pO_2 auf 6,2 mmHg. Dieser Trend setzte sich im verstärkten Maße bis zum Zeitpunkt t_2 und damit bis Ende der Neutronenbestrahlung fort. Es war eine deutliche Drift nach links vonstatten gegangen und der prozentuale Anteil der Werte < 5 mmHg lag nun bei ca. 80 %, wobei der mediane pO_2 auf einen Wert von 0 (\pm) mmHg abgesunken war. 3 Tage nach abgeschlossener Bestrahlung, zum Zeitpunkt t_3 , war diese Links-Drift immer noch deutlich ausgeprägt, wobei das Spektrum der Werte, über einen weiten Bereich verteilt, die hypoxische Fraktion, mit den Werten < 5 mmHg ($pO_2 < 5$ mmHg = 54%) schon wieder im Abnehmen begriffen war und der mittlere pO_2 bei 3,5 mmHg lag. In den folgenden 2 Wochen, zum Zeitpunkt t_4 und t_5 , ergaben die bei jeweils 5 Tieren erhobenen Werte einen Shift nach rechts, die hypoxische Fraktion nahm auf 28 % bzw. 24 % ab und der mittlere pO_2 stieg auf Werte wie zu Beginn des Experiments.

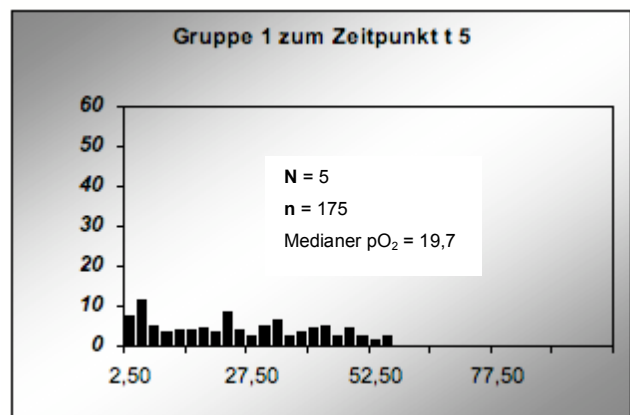
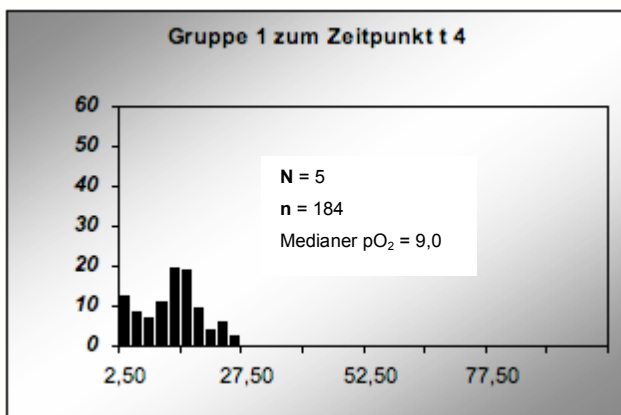
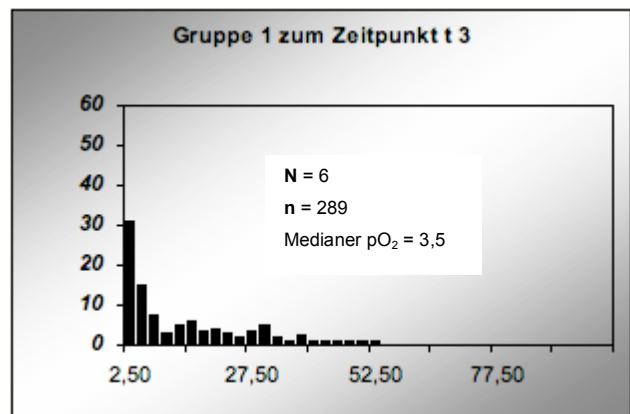
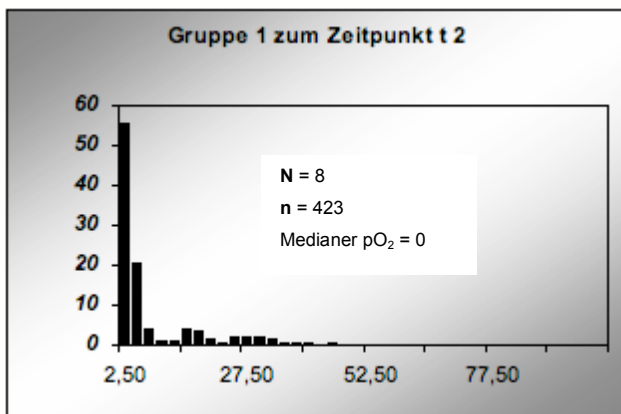
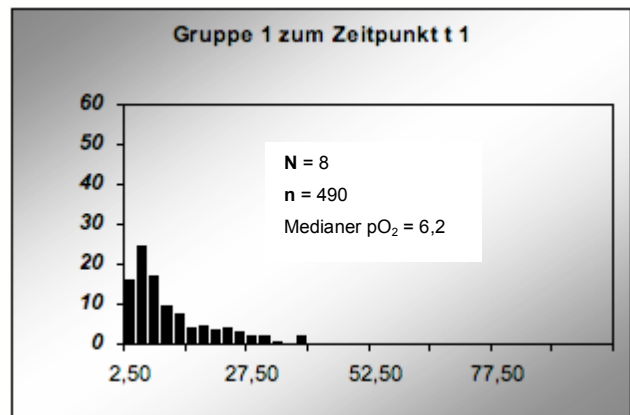
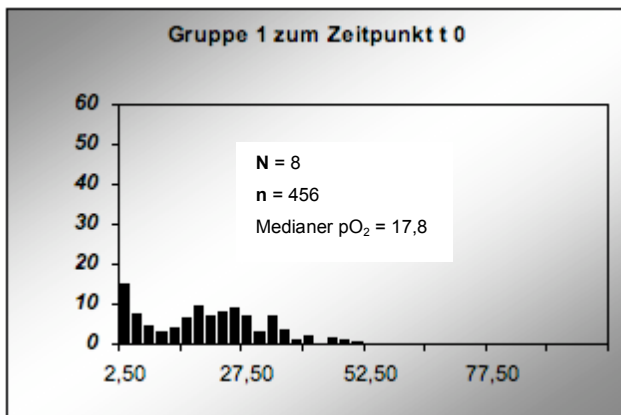


Abbildung 19: Gepoolte pO₂-Histogramme zu den Zeitpunkten t₀ - t₅ aus allen zum jeweiligen Zeitpunkt gewonnen pO₂-Werten unter Bestrahlung mit 6 x 2 Gy Neutronen. Darstellung der prozentualen pO₂-Wertverteilung über den Zeitraum der Bestrahlung bis zum Erreichen der Gesamtdosis von 12 Gy Neutronen und zwei Wochen danach. Dabei nimmt die relative Häufigkeit niedriger pO₂-Werte während der Bestrahlung zu, was sich an einer Linksverschiebung der Histogramme erkennen lässt. Diese Verschiebung ist zwei Wochen nach Bestrahlungsende komplett rückläufig. y-Achse: prozentuale Häufigkeit [%]; x-Achse: mmHg; N = Anzahl der Tiere; n = Anzahl der Messpunkte

5.1.4.2 Verschiebung der prozentualen pO₂-Verteilung unter 6 x 6 Gy Photonen

In der mit einer Photonendosis von 6x6 Gy bestrahlten Gruppe ergab sich über den gesamten Beobachtungszeitraum von 5 Wochen eine breite Verteilung der pO₂-Werte, siehe Abb. 20. Unabhängig von der zum jeweiligen Zeitpunkt erreichten Gesamtdosis zeigten die Balkendiagramme ein breites Spektrum über den Messbereich von 0 – 100 mmHg. Insgesamt sind dennoch ähnliche Beobachtungen in der Verteilung der pO₂-Werte gemacht worden wie in der Neutronengruppe. Der Unterschied in den Gruppen lag lediglich in der Ausprägung.

Im Einzelnen galt für die Gruppe 2 (6x6 Gy Photonen), dass zu Beginn, also zum Zeitpunkt t₀, eine fast gleichmäßige Verteilung der pO₂-Werte über einen Bereich von 0 - 55 mmHg bei 8 Tumoren und 356 Messpunkten bestand. Zum Zeitpunkt t₂ war eine leichte Linksverschiebung eingetreten, wobei im Vergleich zur Gruppe 1 die Streuung aller pO₂-Werte immer noch über einen weiten Bereich reicht und der Shift nicht so deutlich ausgeprägt ist. Der erhobene mittlere pO₂ betrug 13 (±)mmHg und der Prozentsatz der Werte < 5 mmHg lag bei 33 %. Zu t₂ setzte sich die Tendenz des Linksshifts fort. Aber es war weiterhin eine nicht geringe Anzahl der gemessenen Werte bis zu einem Maximalwert von 57,2 mmHg verteilt. Die hypoxische Fraktion war auf 43 % angestiegen und der mittlere pO₂ auf 7,7 mmHg abgesunken. Zu diesem Zeitpunkt ergaben sich erstmals signifikante Unterschiede zur mit Neutronen bestrahlten Gruppe 1. Vor allem der prozentuale Anteil der Werte < 5mmHg war deutlich geringer (pO₂ < 5 mmHg zum Zeitpunkt t₂ in Gruppe 1 = 80 %). Nach Abschluss des Bestrahlungszyklus unter 6 x 6 Gy Photonen zum Zeitpunkt t₃, d.h. 3 Tage nach der letzten Bestrahlung, ergaben sich kaum Unterschiede zu den gewonnenen Werten unter Neutronenstrahlung. Zum Zeitpunkt t₃ lag der mittlere pO₂ bei 7,7 mmHg, die hypoxische Fraktion bei 42 %. Zum Zeitpunkt t₄ entsprach der mittlere pO₂ 9,5 mmHg und die hypoxische Fraktion 39 %. Dies entsprach weitestgehend auch den Beobachtungen in der Gruppe 1. Der unter Bestrahlung beobachtete Linksshift der Histogramme beider Gruppen glich sich ab dem Zeitpunkt t₃ über das gesamte Oxygenierungsspektrum aus. Zum Zeitpunkt t₅, 2 Wochen nach Beendigung der Bestrahlung, hatten wir eine vergleichbare Verteilungskurve, nur der Anteil der hypoxischen Fraktion differiert; in der Gruppe 2 lag der Anteil der pO₂-Werte < 5 mmHg bei 8 % und in der Gruppe 1 bei 24 %.

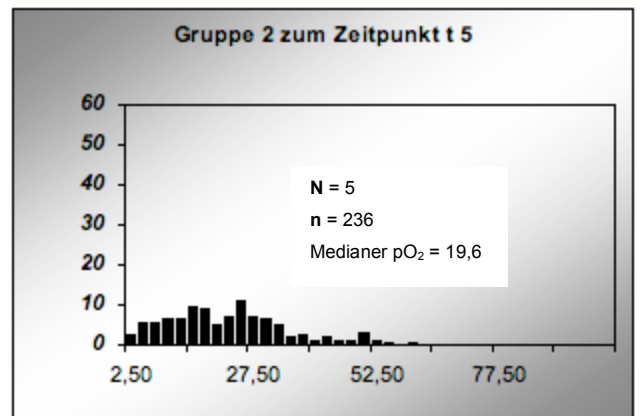
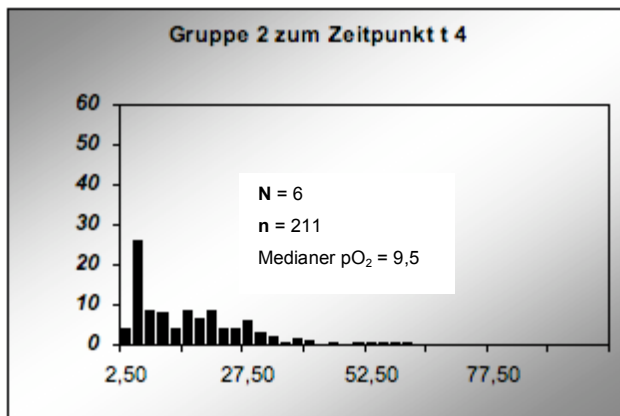
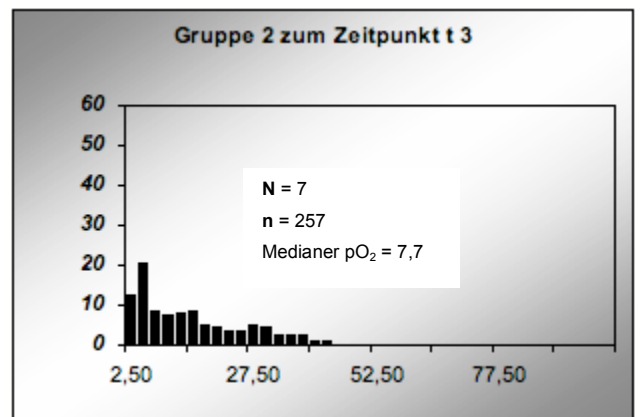
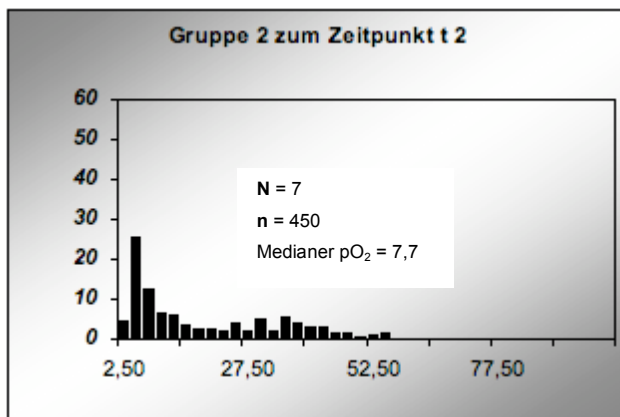
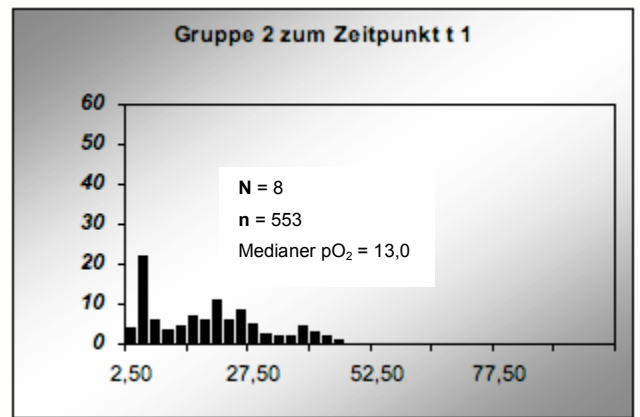
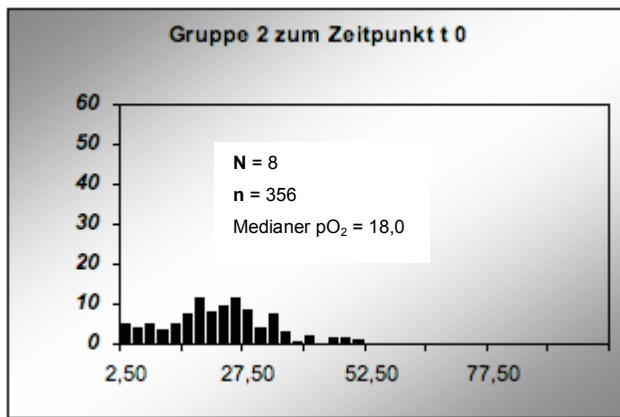


Abbildung 20: Gepoolte pO₂-Histogramme zu den Zeitpunkten t₀ - t₅ aus allen zum jeweiligen Zeitpunkt gewonnen pO₂-Werten unter Bestrahlung mit 6 x 6 Gy Photonen. Darstellung der prozentualen pO₂-Wertverteilung über den Zeitraum der Bestrahlung bis zum Erreichen der Gesamtdosis von 36 Gy Photonen und zwei Wochen danach. Dabei nimmt die relative Häufigkeit niedriger pO₂-Werte während der Bestrahlung zu, was sich in einer Linksverschiebung des Histogramms erkennen lässt. Diese Verschiebung ist zwei Wochen nach Bestrahlungsende komplett rückläufig. y-Achse: prozentuale Häufigkeit [%]; x-Achse: mmHg; N = Anzahl der Tiere; n = Anzahl der Messpunkte

5.1.4.3 Verschiebung der prozentualen pO₂ Verteilung unter 12 x 3 Gy Photonen

Die mit 12 x 3 Gy Photonen bestrahlte Gruppe 3 (Abb. 21, S.55) unterschied sich von den beiden anderen Gruppen. Der Einfluss der Bestrahlung auf die Verteilung der pO₂-Werte, wie in den beiden vorigen Gruppen beobachtet, stellte sich nur in abgeschwächter Form ein und trat auch erst zu einem späteren Zeitpunkt in Erscheinung. Lediglich die Reoxygenierung war in allen drei Gruppen ähnlich ausgeprägt und ist 2 Wochen nach abgeschlossener Bestrahlung eingetreten.

Schon zum Zeitpunkt t₁, nach einer Woche Bestrahlung, und einer bis dahin erreichten Gesamtdosis von 12 Gy, war ein signifikanter Unterschied im Kurvenverlauf und im prozentualen Anteil der Werte < 5 mmHg zu verzeichnen. Es war kaum ein Linksshift eingetreten, welcher in den Gruppen 1 und 2 zu diesem Zeitpunkt schon ausgeprägt war, und die hypoxische Fraktion lag bei 15 %, was im Vergleich zur Gruppe 2 der Hälfte entspricht und zur Gruppe 1 ca. 1/3 des Wertes. Der mittlere pO₂ hingegen war mit 13,9 mmHg auch deutlich im Vergleich zum Ausgangswert abgefallen. Die Gruppe 1 erreichte zu diesem Zeitpunkt einen Wert von 6,2 mmHg und die Gruppe 2 13,0 mmHg. Zum Zeitpunkt t₂ wurde der Unterschied noch augenfälliger; es trat eine leichte Verschiebung nach links ein, die hypoxische Fraktion erreichte eine prozentuale Häufigkeit von 23 % und der mittlere pO₂ sank auf 9,6 mmHg. Die deutliche Linksverschiebung der pO₂-Werte unter der Bestrahlung mit Neutronen und 6 x 6 Gy Photonen war unter der Bestrahlung mit 12x3 Gy Photonen nicht beobachtbar (siehe Kap.: 5.1.4.1, 5.1.4.2). Ab dem Zeitpunkt t₂ veränderten sich die Histogramme in der Gruppe 3 nur unwesentlich. Die mittleren pO₂-Werte erreichten 9,6 mmHg. Die hypoxische Fraktion mit dem prozentualen Anteil der pO₂ Werte < 5 mmHg war 24 %. Die Oxygenierung der untersuchten Osteosarkome behielt eine Konstanz über einen Zeitraum von 3 Wochen, beginnend vom Zeitpunkt t₂ bis zum Zeitpunkt t₄. Danach kam es zu einer Reoxygenierung im Tumorgewebe, welche vergleichbar mit den Gruppen 1 und 2 war. Das Verteilungsmuster der mittleren pO₂-Werte war aber eher der Gruppe 2 ähnlich und auch die mittlere hypoxische Fraktion war, mit einem Wert von 10 %, mit der Gruppe 2 vergleichbar und lag zum Zeitpunkt t₅ bei 8 %.

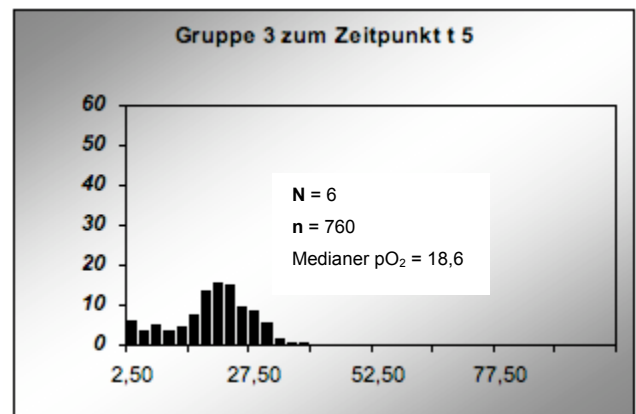
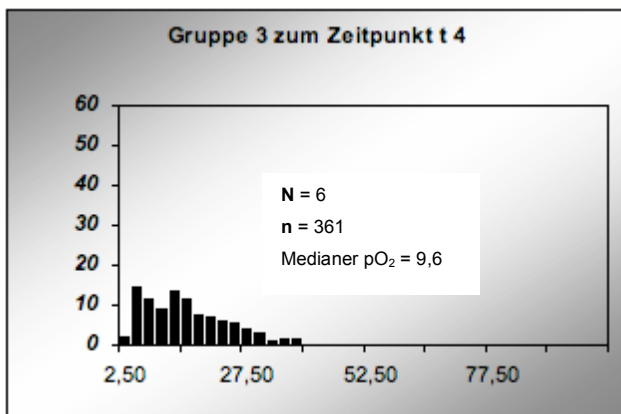
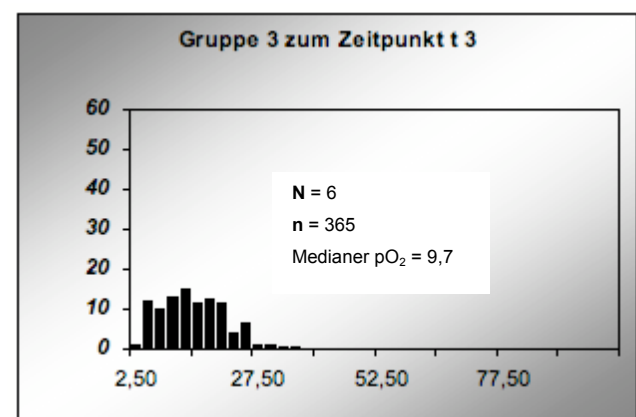
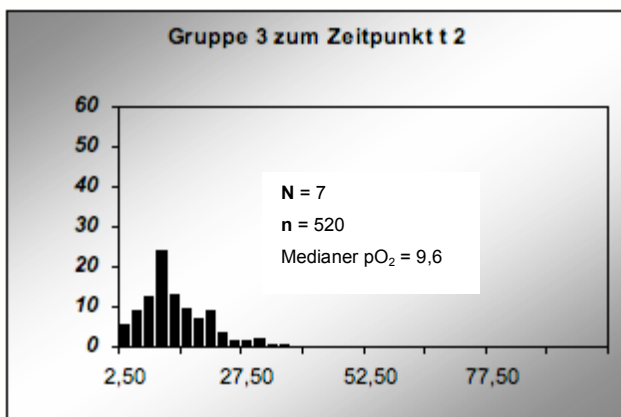
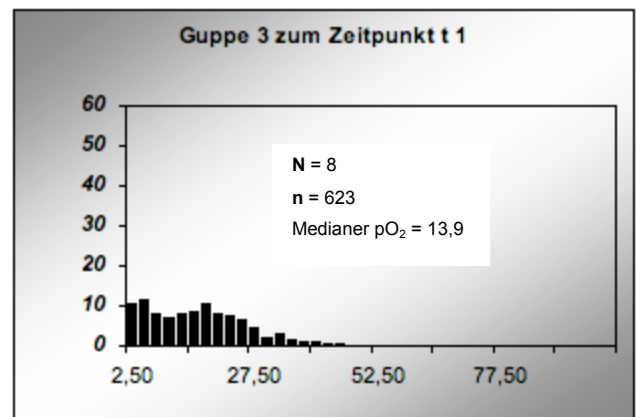
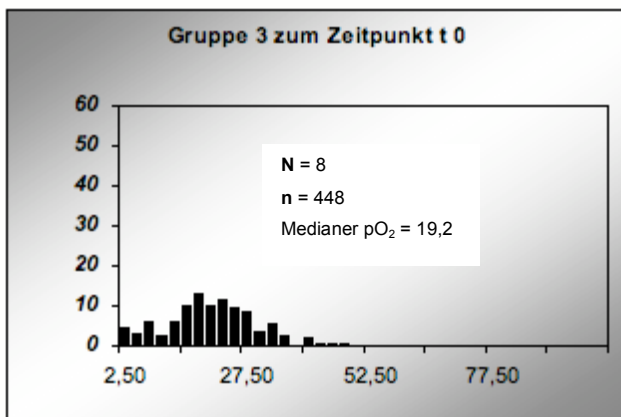


Abbildung 21: Gepoolte pO₂-Histogramme zu den Zeitpunkten t₀ - t₅ aus allen zum jeweiligen Zeitpunkt gewonnen pO₂-Werten unter Bestrahlung mit 12x3 Gy Photonen. Darstellung der prozentualen pO₂-Wertverteilung über den Zeitraum der Bestrahlung bis zum Erreichen der Gesamtdosis von 36 Gy Photonen und zwei Wochen danach. Dabei nur geringfügige Zunahme der relativen Häufigkeit niedriger pO₂-Werte während der Bestrahlung und geringe Linksverschiebung der Histogramme im Unterschied zu Gruppe 1 und 2. Nach Bestrahlungsende ausgeglichene pO₂-Wertverteilung. y-Achse: prozentuale Häufigkeit [%]; x-Achse: mmHg; N = Anzahl der Tiere; n = Anzahl der Messpunkte

5.2 Mammakarzinom

5.2.1 Änderung des Volumens im Tumorgewebe

In einem ersten Untersuchungsschritt wurde die Änderung des Volumens in den vier unterschiedlichen Versuchsgruppen untersucht. Es wurde unterteilt in die Kontrollgruppe, welche als unbestrahlte Referenz-Gruppe diente, die Gruppe 1, die mit 6×2 Gy Neutronen, die Gruppe 2, die mit 6×6 Gy Photonen und die Gruppe 3, die mit 12×3 Gy Photonen bestrahlt wurde. Die Fraktionierungsschemata waren identisch den Versuchen mit den Osteosarkom-tragenden Tieren. Mit den Messungen des Volumens wurde eine Woche vor dem geplanten Bestrahlungsbeginn begonnen. Zu diesem Zeitpunkt t_1 hatten die Tumoren eine durchschnittliche Größe von $300 \pm 25 \text{ mm}^3$, zum Zeitpunkt t_0 erreichten sie eine Durchschnittsgröße von $600 \pm 50 \text{ mm}^3$.

5.2.1.1 Änderung des Volumens in der Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe wurden 5 Mammakarzinom-tragende C3H-Mäuse aus einer Gruppe randomisiert herausgegriffen. Der Vorgang der Bestimmung des Tumolvolumens ist unter dem Kapitel 3.1.1 (S.23) und 4.5.3 (S.35) beschrieben. Die verwendeten Tiere wurden über die gesamte Dauer des Versuchs fortlaufend einzeln vermessen. Ab dem Zeitpunkt t_4 war eine kritische Tumorgöße in der unbestrahlten Kontrollgruppe von durchschnittlich 5.000 mm^3 erreicht. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte der Abbruch des Experiments. Zum Zeitpunkt t_1 war die mittlere Größe der Tumoren auf 968 mm^3 angewachsen, zum Zeitpunkt t_2 erreichten sie ein mittleres Volumen von 1.955 mm^3 , was einer Tumor-Verdoppelungszeit von ca. 10 Tagen entspricht. Im weiteren Verlauf blieb das Wachstum der Tumoren konstant, so dass zum Zeitpunkt t_3 ein Volumen von 3.426 mm^3 bei vier Tieren vorlag, zum Zeitpunkt t_4 ein mittleres Volumen von 5.027 mm^3 bei den verbliebenen drei Tieren. Es konnten nicht alle Tiere über die gesamte Zeit verfolgt werden, da einzelne Tumoren exulcerierten und diese Tiere getötet werden mussten.

5.2.1.2 Änderung des Volumens unter fraktionierter Bestrahlung

Wie aus der Tabelle 5 (Seite 58) ersichtlich, zeigten die drei Gruppen des niedrig oxygenierten Mammakarzinoms AT-17 ein unterschiedliches Ansprechen in ihrem Wachstumsverhalten auf die verwendete Strahlungsart und Höhe der Einzeldosis. Unter Photonenstrahlung trat eine deutlich geringere Wachstumsverzögerung ein als unter

Neutronenstrahlung und zudem verlief mit 6x6 Gy Photonenbestrahlung die Verzögerung ebenfalls markanter als bei 12x3 Gy Photonen Einzeldosen.

In der Gruppe 1, bestrahlt mit Neutronen, wurden zum Zeitpunkt t_1 acht randomisierte Tiere in den Versuch eingeschlossen. Dabei hatten die acht murinen Mammakarzinome des Typs AT-17 ein durchschnittliches Volumen von 298 mm³. Nach einer Woche, zum Zeitpunkt $[t_0]$, erreichten die acht Tumoren ein mittleres Volumen von 593 mm³. Zum Ende der ersten Bestrahlungswoche $[t_1]$ und einer Gesamtdosis von 4 Gy Neutronen ergab sich bei acht Tieren ein weitgehender Wachstumsstillstand. Das mittlere Tumorumfang betrug zu diesem Zeitpunkt $[t_1]$ 604 mm³. Im weiteren Verlauf setzte eine Tumorregression ein, die ein mittleres Tumorumfang von 564 mm³ zum Zeitpunkt $[t_2]$ bei 7 gemessenen Tieren und zum Zeitpunkt $[t_3]$ 500 mm³ bei 5 Tieren erreichte. Eines der Tiere wurde für histologische Zwecke verwandt, die zweite C3H-Maus verstarb. Die Abnahme des mittleren Tumorumfangs hielt bis zum 16. Tag nach Bestrahlungsende $[t_5]$ an und erreichte zu diesem Zeitpunkt ein mittleres Tumorumfang von 397 mm³ bei 4 gemessenen Tieren. Zum Zeitpunkt $[t_6]$ fingen die Tumoren erneut an zu wachsen und hatten ein mittleres Volumen von 415 mm³, bei 4 Tieren.

In der Gruppe 2, bestrahlt mit 6x6 Gy Photonen, beobachteten wir ein ganz ähnliches Verhalten des Tumorumfangs. Anfänglich fand eine Zunahme des Tumorumfangs bis zum Zeitpunkt $[t_1]$, wobei 8 Tumoren ein mittleres Volumen von 671 mm³ erreichten. Ab der 2. Bestrahlungswoche $[t_2]$ begann bei allen 7 vermessenen Tieren eine Tumorregression. Dabei betrug das mittlere Tumorumfang zum Zeitpunkt $[t_2]$ 551 mm³, zum Zeitpunkt $[t_3]$ 519 mm³ bei 6 Tieren und zum Zeitpunkt $[t_4]$ 534 mm³ bei 5 Tieren. Am 16. Tag nach Beendigung der fraktionierten Bestrahlung $[t_5]$ begannen die Tumoren erneut zu wachsen. Sie hatten zum Zeitpunkt $[t_5]$ ein mittleres Volumen von 444 mm³ bei 4 Tieren und zum Zeitpunkt $[t_6]$, was der 3. Woche nach Beendigung der Bestrahlung entsprach, ein mittleres Volumen von 640 mm³ bei ebenfalls 4 Tieren. Die stetige Reduktion der Anzahl an gemessenen Tieren während der Versuchsdauer erklärt sich durch regelmäßige Verwendung von Tumoren zur histologischen Aufarbeitung. Die Beeinflussung des Größenwachstums, in Richtung einer objektiveren Regression, durch die 6 Gy Einzeldosis mit Photonenstrahlung war im Vergleich zur Gruppe, die mit Neutronenstrahlung behandelt wurde, nicht so deutlich ausgeprägt. Zudem setzte die erwartete Größenzunahme nach Ende der Photonenbestrahlung früher ein als bei den mit Neutronen bestrahlten Tieren (siehe Tabelle 5, S. 58).

In der Gruppe 3 wurden die AT-17-Mammakarzinome mit 12x3 Gy Photonen bestrahlt und über den gesamten Versuchszeitraum für regelmäßige Messungen im wöchent-

lichen Intervall herangezogen. Auch in dieser Gruppe beobachteten wir nach einer Bestrahlungswoche zum Zeitpunkt $[t_1]$ eine Verminderung des Tumorwachstums, die aber im Vergleich zur Gruppe 1 und 2 wesentlich geringer ausfiel. Das mittlere Tumorumfang betrug zum Zeitpunkt $[t_1]$ 766 mm^3 bei 8 Tieren. Ab dem Zeitpunkt $[t_2]$, entsprechend einer Gesamtdosis von 30 Gy Photonen, kam es erstmals zu einem Wachstumsstillstand mit einem mittleren Volumen von 755 mm^3 bei 7 Tieren. Im weiteren Versuchsverlauf verminderte sich das Volumen aller gemessenen Tumoren, so dass zum Zeitpunkt $[t_3]$ ein mittleres Tumorumfang von 625 mm^3 bei 6 Tieren vorlag und zum Zeitpunkt $[t_4]$ ein Minimum von 593 mm^3 bei 5 Tieren zu verzeichnen war. Danach kam es bei den verbliebenen 4 Tieren zu einem rasanten Wachstum des AT-17-Mammakarzinoms und einer der Kontrollgruppe vergleichbaren Tumordoppelungszeit von 10 Tagen.

	Mittleres Volumen in mm^3							
Gruppe 1 6x2Gy Neutronen	298 N=8	593 N=8	604 N=8	564 N=7	500 N=5	420 N=4	397 N=4	415 N=4
Gruppe 2 6x6Gy Photonen	305 N=8	613 N=8	671 N=8	551 N=7	519 N=6	534 N=5	444 N=4	640 N=4
Gruppe 3 12x3Gy Photonen	323 N=8	608 N=8	766 N=8	755 N=7	625 N=6	593 N=5	903 N=4	1640 N=4
	$t_{[-1]}$	$t_{[0]}$	$t_{[1]}$	$t_{[2]}$	$t_{[3]}$	$t_{[4]}$	$t_{[5]}$	$t_{[6]}$
	Zeit in Wochen							

Tabelle 5: Änderung des mittleren Volumens der AT-17 Mammakarzinome unter Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlqualitäten und Fraktionierungsschemata. Vergleich der gemessenen Durchschnittsvolumina über einen Zeitraum von 7 Wochen im wöchentlichen Intervall. In der Gruppe 1 und Gruppe 2 kam es zu einer früheren Wachstumsverzögerung, zu einer ausgeprägteren Tumorregression und zu einer später einsetzenden Tumorprogression als in der Gruppe 3. t_1 = eine Woche vor Bestrahlungsbeginn, t_0 = Zeitpunkt des Beginns der Bestrahlung, $t_1 - t_2$ = während der Bestrahlung, $t_3 - t_6$ = nach Bestrahlung. N beschreibt die Anzahl der gemessenen Tiere.

5.2.2 Änderung des Sauerstoffpartialdrucks im Tumorgewebe

Retrospektiv ist das verwendete AT-17-Adenokarzinom zur Untersuchung des Sauerstoffpartialdrucks mittels Eppendorfffeinnadelsonde weniger gut geeignet, da bei einem medianem pO_2 von $3,2 \text{ mmHg}$ vor Bestrahlung in allen untersuchten Gruppen und bei einem mittleren Tumorumfang von $600 \pm 50 \text{ mm}^3$ ein Bereich erreicht ist, der durch die Messungsgenauigkeit dieser Technik an seine Grenzen stößt. So sind die ermittelten Werte der drei untersuchten Gruppen mit Vorbehalt zu verstehen.

5.2.2.1 Änderung des Sauerstoffpartialdrucks unter fraktionierter Bestrahlung

In der Tabelle 6 (S. 61) sind die medianen pO_2 -Werte in tabellarischer Form dargestellt. Als Reverenzgruppe diente die unbestrahlte Kontrollgruppe. Wie bei einem hypoxischen Tumormodell zu erwarten, lag der mediane pO_2 in allen drei bestrahlten Gruppen und der Kontrollgruppe bei 3 mmHg und die hypoxische Fraktion, definiert als der prozentuale Anteil der pO_2 -Werte unter 5 mmHg, erreichte bei allen Gruppen einen durchschnittlichen Wert von über 90 %. Somit war schon zu Beginn des Versuchs die Aussagekraft der mittels Eppendorfffeinnadelsonde erhobenen Ergebnisse beim AT-17-Adenokarzinom sehr eingeschränkt. Im weiteren Verlauf wurde innerhalb der ersten Beobachtungswoche eine kontinuierliche Abnahme der pO_2 -Werte in allen Gruppen verzeichnet. Die geringe Differenz zwischen den einzelnen Gruppen ist auf die begrenzte Messgenauigkeit zurückzuführen. Ab dem Zeitpunkt t_1 gingen die gemessenen Werte gegen 0 mmHg.

In der Kontrollgruppe bewegten sich die medianen pO_2 -Werte über den gesamten Beobachtungszeitraum von 2,7 mmHg zu Beginn bis 1,4 mmHg zum Zeitpunkt t_3 . Der letzte erhobene Wert zum Zeitpunkt t_4 betrug 2,0 mmHg. Zu diesem Zeitpunkt hatte der Tumor ein mittleres Volumen von 5.000 mm³ erreicht. Wie aus der Tabelle 7 (S. 61) ersichtlich, lag die hypoxische Fraktion vom Beginn des Versuchs bis zum Ende der Versuchsreihe, in der 4. Woche nach fiktivem Bestrahlungsbeginn, zwischen 91 und 87 %. Entsprechend dem Tumormodell wies das AT-17-Adenokarzinom über den ganzen Beobachtungszeitraum eine homogene und hypoxische Verteilung der medianen pO_2 auf. Eine Abhängigkeit des medianen pO_2 von der TumorgroÙe lieÙ sich nicht beobachten, da eine Hypoxie des Tumorgewebes schon zu Beginn des Versuchs vorlag und eine Änderung durch Wachstum nicht zu erwarten war.

In der Gruppe 1, die mit einer Spaltneutronendosis von 6x2 Gy bestrahlt wurde, erreichte der mediane pO_2 zum Zeitpunkt t_1 einen Wert von 0 mmHg, die hypoxische Fraktion einen Wert von 97,8 %. Ab diesem Zeitpunkt wurden bis zum Ende des Versuchs keine höheren pO_2 -Werte mehr erreicht und die hypoxische Fraktion bewegte sich um die 95 %. Es kam auch nach dem Ende der Bestrahlung zu keiner Reoxygenierung des bestrahlten Gewebes.

In der Gruppe 2, die mit 6 x 6 Gy Photonen bestrahlt wurde, war ab dem Zeitpunkt t_1 der mediane pO_2 ebenfalls auf Werte um die 0 mmHg abgesunken. Der Prozentsatz der Werte unter 5 mmHg beträgt 98,7 %. Im weiteren Verlauf änderte sich der mediane pO_2 nur geringfügig. Die hypoxische Fraktion verhielt sich identisch, siehe Tabelle 7 (Seite 61). Zwei Wochen nach Ende der Bestrahlung stieg der pO_2 leicht an, auf Werte

wie zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns (pO_2 zum Zeitpunkt t_5 betrug 3,3 mmHg). Die hypoxische Fraktion nahm zu diesem Zeitpunkt [t_5] deutlich ab (HF zum Zeitpunkt [t_5] beträgt 68,3 %). Zum Ende des Versuchs, 21 Tage nach der letzten Bestrahlung, betrug der mediane pO_2 , bei vier Tieren 3,1 mmHg und die hypoxische Fraktion 70,1%. In diesem Fall kann man unter dem Vorbehalt der Messungengenauigkeit von einer Reoxygenierung sprechen.

In der Gruppe 3 beobachteten wir ein ähnliches Verhalten des Tumors unter Bestrahlung mit 12×3 Gy Photonen. Hier fiel der mediane pO_2 kontinuierlich ab, wobei im Vergleich zu den Gruppen 1 und 2 erst zum Zeitpunkt t_2 sehr niedrige Werte auftraten (medianer pO_2 zum Zeitpunkt [t_2] 0,6 mmHg). Zum Zeitpunkt t_2 und t_3 änderte sich nichts an der Tumoroxygenierung. Auch die hypoxische Fraktion blieb unverändert auf Werten zwischen 90 – 95 %. Ab dem Zeitpunkt t_4 , eine Woche nach Ende der Bestrahlung, stieg der mediane pO_2 bei allen fünf Tieren auf einen Wert von 1,8 mmHg geringfügig an. Die hypoxische Fraktion verringerte sich (zum Zeitpunkt t_4 : $pO_2 = 1,8$ mmHg, HF = 86,6 %). Zum Zeitpunkt t_5 setzte sich diese Tendenz fort, wobei der mediane pO_2 mit 6,7 mmHg über dem Ausgangswert zum Bestrahlungsbeginn lag und die hypoxische Fraktion einen Prozentsatz unter 50 einnahm. Zum Zeitpunkt [t_6] betrug der mediane pO_2 4,5 mmHg und die hypoxische Fraktion 54,6% (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7, S. 61). Vergleicht man diese Werte mit den beiden anderen Gruppen, so zeigte sich, dass unter niedrigeren Einzeldosen die Oxygenierung des Tumorgewebes später abnahm und nach Beendigung der Bestrahlung früher eine Reoxygenierung einsetzte. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Ergebnissen, die mit dem gut oxygenierten Osteosarkom gewonnen wurden (siehe Kapitel 5.1.2.2, S.43).

	Medianer pO ₂ in mmHg						
Kontrollgruppe	2,7 N=5	2,1 N=5	2,2 N=5	1,4 N=5	2,0 N=5	Versuchs- Abbruch	Versuchs- Abbruch
Gruppe 1 6x2 Gy Neutronen	3,2 N=8	0 N=8	0 N=7	0 N=5	0 N=4	0 N=4	0,2 N=4
Gruppe 2 6x6 Gy Photonen	2,7 N=8	0 N=8	0,4 N=7	0,9 N=6	0,7 N=5	3,3 N=4	3,1 N=4
Gruppe 3 12x3 Gy Photonen	3,2 N=8	2,4 N=8	0,6 N=7	0,4 N=6	1,8 N=5	6,7 N=4	4,5 N=4
	t _[0]	t _[1]	t _[2]	t _[3]	t _[4]	t _[5]	t _[6]
	Zeit in Wochen						

Tabelle 6: Mittlere pO₂-Werte des AT-17-Adenokarzinoms in mmHg unter fraktionierter Bestrahlung im zeitlichen Verlauf über 6 Wochen. Bestrahlungsbeginn zum Zeitpunkt t₀, Bestrahlungsende zum Zeitpunkt t₃. Gleichmäßiger medianer pO₂ in der Kontrollgruppe von Beginn bis Ende; Abfall des medianen pO₂ in den bestrahlten Gruppen in unterschiedlicher Ausprägung. N entspricht der Anzahl der gemessenen Tiere.

	Mittlere hypoxische Fraktion in % (pO ₂ Werte < 5 mmHg)						
Kontrollgruppe	91,2 N=5	92,7 N=5	89,8 N=5	95,1 N=5	87,0 N=5	Versuchs- Abbruch	Versuchs- Abbruch
Gruppe 1 6x2 Gy Neutronen	83,4 N=8	97,8 N=8	94,1 N=7	96,7 N=5	95,1 N=4	100 N=4	97,4 N=4
Gruppe 2 6x6 Gy Photonen	89,9 N=8	98,7 N=8	96,4 N=7	88,8 N=6	83,7 N=5	68,3 N=4	70,1 N=4
Gruppe 3 12x3 Gy Photonen	83,6 N=8	95,2 N=8	96,3 N=7	90,8 N=6	86,6 N=5	39,7 N=4	54,6 N=4
	t _[0]	t _[1]	t _[2]	t _[3]	t _[4]	t _[5]	t _[6]
	Zeit in Wochen						

Tabelle 7: Hypoxische Fraktion als Anteil der pO₂-Werte unter 5 mmHg in Prozent aller Werte beim AT-17-Adenokarzinom unter unterschiedlich fraktionierter Bestrahlung über den zeitlichen Verlauf. Bestrahlungsbeginn zum Zeitpunkt t₀, Bestrahlungsende zum Zeitpunkt t₃. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bei überwiegend hohem prozentualen Anteil der pO₂ Werte < 5 mmHg. N entspricht der Anzahl der gemessenen Tiere.

6 Diskussion

Die Zielsetzung dieses Versuchs war es, am Beispiel des gut oxygenierten Osteosarkoms und des niedrig oxygenierten AT-17-Adenokarzinoms das Oxygenierungsverhalten unter fraktionierter Bestrahlung mit unterschiedlicher Strahlungsqualität und unterschiedlichen Einzeldosen zu untersuchen. Prämisse war ein möglichst enger Bezug zur klinischen Anwendung, deshalb wurden dem klinischen Alltag ähnliche Fraktionierungsschemata und das kontinuierliche Vermessen ein und desselben Tumors bevorzugt.

Retrospektiv hat sich das AT-17-Adenokarzinom als wenig geeignet erwiesen, da die Methode der Sauerstoffpartialdruckbestimmung mittels des Eppendorf-Histographen bei niedrig oxygeniertem Gewebe deutlich an ihrer Aussagekraft verliert. Die Limitierung dieser Messmethode bei pO_2 -Werten unter 5 mmHg wurde auch in der Arbeit von Swartz dargelegt (Swartz 2002, S. 249). Bezüglich einer Beeinflussung der erhobenen Werte durch wiederholte Messung in ein und demselben Tumor über den gesamten Versuch und der damit einhergehenden Traumatisierung des Gewebes (Zywietz 1995, S. 1393-1395; Swartz 2002, S. 249) konnte durch einen Vergleich aller erhobenen Werte, sowohl des pO_2 wie auch der hypoxischen Fraktion, mit der Arbeit von Thürrigl (Thürrigl 2005, S. 38) nachgewiesen werden, dass dieser Effekt zu vernachlässigen ist.

6.1 Einfluss der verwendeten Strahlung auf die Wachstumsverzögerung bei xenotransplantierten Osteosarkomen und AT-17-Adenokarzinomen

In den Versuchen zeigte sich, dass, unabhängig vom verwendeten Tumormodell, der Effekt auf das Wachstumsverhalten bei fraktionierter Neutronenstrahlung größer ist als bei fraktionierter Photonenstrahlung. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen aus klinischen Studien (Auberger 1997 und 1998, S. 137-147).

Auf Grund der gewonnenen Wachstumsverzögerungskurven muss bei der Spaltneutronenstrahlung am Reaktor Garching von einem RBE größer 3 ausgegangen werden. Dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen von Ries (Ries 1985, S. 21; Breitner 1986, S. 1031-1038; Köster 1984, S. 79-96; Kummermehr 1989, S. 276-282), die einen geringeren RBE ergeben hatten.

Der gute therapeutische Effekt der Spaltneutronen ist unter klinischen Bedingungen limitiert durch die geringe Eindringtiefe der Neutronen und die durchaus erhebliche Schädigung des Umgebungsgewebes.

6.2 Einfluss der verwendeten Strahlung auf die Oxygenierung bei xenotransplantierten Osteosarkomen und AT-17-Adenokarzinomen

Die Oxygenierung von soliden Tumoren spielt eine entscheidende Rolle im Ansprechverhalten auf eine strahlen- oder/und chemotherapeutische Behandlung. In vorangegangenen Untersuchungen konnte die eindeutige Abhängigkeit einer lokalen Tumorkontrolle vom Oxygenierungsgrad gezeigt werden (Brizel 1997, S. 285-289; Gatenby 1988, S. 831-838). Auf Grund dieser Ergebnisse rückt die Erfassung der Tumoroxygenierung ins Zentrum des Interesses. Es haben sich verschiedene direkte und indirekte Methoden zur Erfassung der lokalen Oxygenierung im Tumorgewebe etabliert, wobei sich bisher das invasive Verfahren mittels des Eppendorf-Histographen als „Golden Standard“ herauskristallisiert hat.

6.2.1 Wertigkeit der erhobene pO_2 -Werte unter Berücksichtigung von äußeren Störfaktoren

Es treten verschiedene Störfaktoren bei Verwendung der pO_2 -Messung mit dem Eppendorf-Histographen in Erscheinung:

- a) wiederholte Messung ein und desselben Tumors und der damit einhergehenden Traumatisierung des Gewebes
- b) der Einfluss der Anästhesie auf die Oxygenierung des Gewebes
- c) die Körpertemperatur der tumortragenden Tiere
- d) der strukturelle Aufbau des Tumors
- e) die Ungenauigkeit einer Vorhersage der Verteilung der einzelnen Messpunkte im Gewebe.

Zu a)

Hierbei stellt sich die Frage, inwieweit die ab der zweiten Messung erstellten Werte durch die vorangegangene Traumatisierung des Tumorgewebes beeinflusst sind. Zywiets (Zywiets 1995, S. 1396) und Schramm (Schramm 1990, S. 38-50) konnten zeigen, dass die lokale Traumatisierung während einer Messung zu vernachlässigen ist. Wiederholte Messungen in Folge wurden in diesen Versuchen nicht vorgenommen. Durch Vergleiche mit den von Thürriegl (Thürriegl 2005) erhobenen Werte lässt sich sagen, dass bei der Beibehaltung eines zeitlichen Intervalls von zirka einer Woche zwischen den Messungen kein signifikanter Unterschied besteht. Dennoch ist eine Veränderung des Gewebes in Form von Nekrose- und Narbengewebebildung durch die Feinnadelsonde zu berücksichtigen.

Zu b)

Eine weitere Störgröße, welche in diesem Experiment zum Tragen kommt, ist der Einfluss der Narkose auf den Blutfluss und die Sauerstoffsättigung im zu untersuchenden Gewebe. Zu dieser Fragestellung haben Zywiets (Zywiets 1995, S. 1391-1400) und Adam (Adam 1999, S. 173-174) belegen können, dass in Abhängigkeit von der verwendeten Narkoseart und der möglichen Sauerstoffapplikation während der Narkose große Unterschiede in den gemessenen pO_2 -Werten bestehen. Auf Grund der Verwendung von Mäusen war es nicht möglich, eine ventilationsgesteuerte Narkose mit zu erwartenden konstanten Blutgaswerten zu gewährleisten. Um den Effekt möglichst gering zu halten, wurden die Tiere unmittelbar nach Eintreten der Sedierung der pO_2 -Messung zugeführt.

Zu c)

Die Körperkerntemperatur, wie auch die damit in Verbindung stehende periphere Temperatur, beeinflusst in erheblichem Maße die Durchblutung und damit die Oxygenierung des Gewebes. Um diesen Faktor weitgehend zu minimieren, wurde eine externe, durch kontinuierliche Kontrolle gesteuerte Wärmezuführung bereitgestellt (siehe Kapitel 3.2.4).

Zu d)

Die Bestimmung der pO_2 -Werte in Feinnadelsondentechnik ist äußerst anfällig auf den lokal an der Spitze der Sonde auftretenden Anpressdruck. Die Bewegungsmechanik der Eppendorf-Sonde ist der Art, den auftretenden Druck an der Sondenspitze zu minimieren. Dennoch ist der Widerstand, der der Sonde entgegengesetzt wird, in unterschiedlichen Geweben verschieden, wodurch es zu Artefakten bei der Messung kommen kann. Die verwendeten Osteosarkome auf den halb C-Mäusen haben eine Tendenz zur Kalzifizierung, welche unter Bestrahlung in Abhängigkeit von der applizierten Gesamtdosis zunimmt (sichtbare Kalzifizierungsareale im MRT-Bild, Abbildung 12, S. 34). Bei Messungen im kalzifizierten Tumorgewebe sind deshalb keine Aussagen zur tatsächlichen Oxygenierung zu machen. Um diesen Effekt zu eliminieren, wurden stark kalzifizierte Tumoren aus der Versuchsreihe ausgeschlossen. Dieses Phänomen trat bei den verwendeten Adenokarzinomen nicht auf.

Zu e)

Anhand der Größe der Tumoren wurde die Anzahl der Messpunkte prozentual festgesetzt (siehe Kapitel 4.5.2, S.32). Dennoch waren vor allem unter zunehmender Reduktion des Tumorumfanges keine eindeutigen Aussagen über die Verteilung der

gemessenen pO_2 -Werte zu machen. Es wurde versucht, ein möglichst breites Spektrum von gewonnenen Einzelmesspunkten über den gesamten Tumor zu gewinnen und damit ein repräsentatives Ergebnis zu bekommen.

6.2.2 Einfluss von fraktionierter Niedrig-LET- und Hoch-LET-Strahlung auf den Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe

Durch die Arbeiten von Thomlinson (Thomlinson 1955, S. 539-549) und Gray (Gray 1953, S. 638-648), ist unbestritten, dass die Oxygenierung des Tumors einen wichtigen Faktor in der strahlentherapeutischen Behandlung von Karzinomen darstellt. Klinische Studien konnten belegen, dass die lokale Kontrolle oder die Regression eines soliden Tumors deutlich von dem Oxygenierungsgrad des jeweiligen Tumors abhängt. Polarographische Untersuchungen von Halstumoren mit sowohl niedrigem als auch hohem Oxygenierungsgrad zeigen unterschiedliche Ergebnisse unter Strahlentherapie. Allgemein ist dabei die Tendenz, dass niedrig oxygenierte Tumore schlechter auf die Behandlung ansprechen (Nordsmark 1996, S. 31-44; Brizel 1997, S. 285-289; Gatenby 1988; S. 831-838). In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass nicht nur die lokale Kontrolle eines Tumors von der jeweiligen Oxygenierung beeinflusst wird, sondern auch eine gesteigerte Metastasierung von Tumorzellreihen (Reynolds 1996, S. 5754-5757; Graeber 1996, S. 88-91; Yuan und Glazer 1998, 439-446) an humanen Hals-, Cervix- und Weichteilkarzinomen auftreten kann (Walenta 1997, S. 409-415; Brizel 1996, S. 941-943; Höckel 1996, S. 4509-4515).

Osteosarkom

Zusammenfassend ergab sich in diesem Versuchsaufbau mit dem Osteosarkom, als einem gut oxygenierten Tumormodell, dass es unabhängig von der verwendeten Strahlung während der Radiatio zu einem Abfall des mittleren pO_2 -Wertes kam, gefolgt von einem Anstieg nach Ende des Bestrahlungszyklus, d.h. es tritt eine Reoxygenierung ein.

Unterschiede ergaben sich in der Ausprägung der Oxygenierung während der Bestrahlung. So war in der Gruppe 1, die mit 6x2 Gy Neutronen bestrahlt worden war, der tiefste ermittelte mediane pO_2 -Wert mit 0 mmHg, in der Gruppe 2, die mit 6 x 6 Gy Photonen bestrahlt worden war, mit 7,7 mmHg und in der Gruppe 3, die mit 12 x 3 Gy Photonen bestrahlt worden war, mit 9,6 mmHg erreicht.

Ein weiterer Unterschied waren die Zeitpunkte, zu denen eine Änderung in der Tumoroxygenierung eingetreten waren. Es kam in der mit 6x2 Gy Neutronen bestrahlten Gruppe 1 zu einem früheren und dramatischeren Abfall des medianen pO_2 . Der tiefste Wert wurde ca. 1 Woche vor der Gruppe 2, die mit 6 x 6 Gy Photonen bestrahlt wurde,

und 1 ½ Wochen früher, als in der mit 12 x 3 Gy Photonen bestrahlten Gruppe 3 erreicht. Die Reoxygenierung verhielt sich ähnlich; in der Gruppe 1 setzte die Reoxygenierung 1 - 1 ½ Wochen früher ein als bei den beiden Vergleichsgruppen.

AT-17-Adenokarzinom

Zusammenfassend kam es bei dem AT-17-Adenokarzinom, einem primär niedrig oxygenierten Tumormodell, unabhängig von der verwendeten Strahlung zu einem weiteren Abfall der Oxygenierung unter Bestrahlung, vergleichbar den Osteosarkomen. Nach Ende der Bestrahlung setzte aber in der mit Neutronen bestrahlten Gruppe 1 keine den Osteosarkomen vergleichbare Reoxygenierung ein.

In der Vergangenheit wurde oft vermutet, dass strahlentherapeutische Anwendungen zu einer Reoxygenierung im lokalen Tumorgewebe führen (Afzal 1991, S. 473-477; Höckel 1993, S. 25-50). In anderen Arbeiten konnte diese Vermutung bestätigt werden, wobei im Vergleich zu der hier vorliegenden Arbeit meist hohe Einzeldosen Verwendung fanden. So konnte Vaupel et al. (Vaupel 1984, S. 773-782) eine Reoxygenierung bei malignen Mammakarzinomen auf Mäusen 72 h nach Verabreichung einer Einzeldosis von 60 Gy nachweisen. Koutcher et al. zeigte ebenfalls einen Anstieg des pO₂-Wertes beim selben Tumormodell nach 3 - 4 Tagen nach Verabreichung von 32 bzw. 65 Gy. In der vorliegenden Arbeit wurde in Anlehnung an die klinische Anwendung die Reoxygenierung unter fraktionierter Bestrahlung nachgewiesen. Zywiets et al. (Zywiets 1995, S. 1391-1400) untersuchten die Oxygenierung eines Rhabdomyosarkoms an Ratten unter fraktionierter Bestrahlung bis zu einer Gesamtdosis von 60 Gy, dabei stellte er keine wesentliche Änderung des pO₂ während der ersten 3 Bestrahlungswochen fest. Im weiteren Verlauf seiner Beobachtungen kam es ab einer Dosis von 45 Gy zu einer zunehmenden Hypoxie im Tumorgewebe. Diese Ergebnisse decken sich nicht mit denen in dieser Arbeit. Hier war schon ab der 1. Bestrahlungswoche, unabhängig von der verwendeten Strahlung, ein Abfall des mittleren pO₂ eingetreten. Darüber hinaus ist eine Reoxygenierungstendenz bei Zywiets et al. anhand des medianen pO₂ nicht auszumachen. Hier liegt aber auch der Unterschied der Arbeiten, da eine eindeutige Reoxygenierung in der vorliegenden Arbeit nur nach Ende der Bestrahlung signifikant wurde, Zywiets aber bis zum Ende seines Versuchs weiter bestrahlte.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, bestehen deutliche Unterschiede in der Oxygenierung unterschiedlicher Tumoren und deren Reoxygenierungsverhalten unter Bestrahlung. Die gut oxygenierten Osteosarkome zeigten, unabhängig von der Bestrahlungsart, eine ausgesprochen hohe Reoxygenierung nach Ende der Bestrahlung,

vergleichbar mit den Arbeiten von Kallman et al. (Kallman 1986, S. 681-685) und Kitakabu et al. (Kitakabu 1991, S. 709-714). Eine weitere Besonderheit war, dass trotz sehr niedriger Oxygenierung der Osteosarkome während der Bestrahlung mit Neutronen und der hierbei zu vermutenden Zerstörung der kapillären Versorgung des Tumors und konsekutiver Nekrosebildung, nach Ende der Neutronentherapie eine zügige und sehr gute Reoxygenierung einsetzt. Dieses Ergebnis ist vergleichbar der Arbeit von Zywietz et al. (Zywietz 1995, S. 1391-1400), wobei hier hohe Gesamtdosen von bis zu > 45 Gy Photonen verwendet wurden. Die bisher angenommene Affektion der Tumorgefäße bei hohen Gesamtdosen oder bei Hoch-LET-Strahlung, wie in diesem Versuch, ist anzuzweifeln. Es lassen die gemessenen medianen pO_2 Werte eher den Schluss zu, dass während der Bestrahlung eine Durchblutungsumverteilung im Gewebe stattfand und dadurch eine passagere Hypoxie eintrat. In den Arbeiten von Yamaura und Matsuzawara (Yamaura und Matsuzawa 1979, S. 201-219) konnte gezeigt werden, dass nach einer hohen Einzeldosis das Tumorstadium von gut vaskularisierten Tumorarealen ausging und nicht, wie zu erwarten, von hypoxischen Arealen. In Verbindung mit der Arbeit von Brown (Brown 1979, S. 650-656) lässt sich hieraus schließen, dass eine niedrige Oxygenierung im Tumorgewebe nicht zwangsläufig mit Nekrosearealen in Verbindung steht, sondern der Blutfluss im Tumor sehr variabel ist und sich durch unbekannte äußere Einflüsse stark ändern kann. Der wichtigste Faktor, der Einfluss auf die Durchblutung und auf die Oxygenierung eines Tumors ausübt, ist die Schrumpfung des bestrahlten Gewebes. Dies ging aus dieser Arbeit eindeutig hervor. Nicht die verwendete Strahlungsart, sondern die damit erreichte Tumorverkleinerung war ausschlaggebend für die Reoxygenierung der untersuchten Tumoren.

6.2.3 Prozentuale Verschiebung des Sauerstoffpartialdrucks im Tumorgewebe unter fraktionierter Niedrig-LET- und Hoch-LET-Strahlung

Untersuchungen an humanen Tumoren haben impliziert, dass ein niedriger Oxygenierungsstatus eines Tumors eng korreliert mit einem verminderten Ansprechen auf Strahlentherapie (Gatenby 1988, S. 831-838; Höckel 1993, S. 25-50). Weiterführend konnten Horsmann et al. (Horsman 1994, S. 439-442) belegen, dass der mittels Eppendorf-Histogrammen ermittelte prozentuale Anteil der pO_2 -Werte < 5mmHg mit dem Anteil der histologisch gesicherten hypoxischen Fraktion eines Tumors korreliert. Er machte diese Untersuchungen an Mammakarzinomen, transplantiert auf C3H-Mäusen, und verglich die polarographisch gewonnenen Werte mit den histologischen Ergebnissen der Tumoren.

Zywietz et al. (Zywietz 1995; S. 1391-1400) zeigten, dass unter fraktionierter konventioneller Bestrahlung eine Verschiebung der prozentualen Verteilung der pO_2 -Werte zu den niedrigeren Werten in den gepoolten Histogrammen zu beobachten ist. Hierbei untersuchte er auf Ratten transplantierte Rhabdomyosarkome im zeitlichen Verlauf bis zum Erreichen einer Gesamtdosis von 60 Gy innerhalb von 4 Wochen. Bis zur 3. Woche, entsprechend einer Gesamtdosis von 30 Gy, war nur eine geringe Zunahme der hypoxischen Fraktion aufgetreten, danach kam es zu einer deutlichen Zunahme der hypoxischen Fraktion bis zum Ende des Versuchs, wobei das Bestrahlungsende mit dem Versuchsende einherging. Zu ähnlichen Ergebnissen kam die vorliegende Arbeit. Man muss aber zwischen den unterschiedlichen Strahlungsqualitäten differenzieren.

In der Gruppe 1, die mit 6x2 Gy Neutronen bestrahlt wurde, stieg der prozentuale Anteil der pO_2 -Werte unter 5 mmHg nach der ersten Bestrahlungswoche an. Im weiteren Verlauf setzte sich dieses Phänomen bis zum Ende der Bestrahlung fort. Ab der 4. Versuchswoche nahm die hypoxische Fraktion wieder ab, entsprechend den Beobachtungen des Verhaltens des medianen pO_2 .

Bei der Gruppe 2, die mit 6 x 6 Gy Photonen bestrahlt wurde, beobachteten wir Vergleichbares. Im Gegensatz hierzu war bei der Gruppe 3, mit 12 x 3 Gy Photonen bestrahlt, während und nach der Bestrahlung kein signifikanter Anstieg der hypoxischen Fraktion zu verzeichnen. Trotz des Abfalls des mittleren pO_2 während der Bestrahlung waren die erhobenen pO_2 -Werte immer ausgeglichen über einen Bereich von 0 – 40 mmHg verteilt.

Beim AT-17-Adenokarzinom war, wie bei einem niedrig oxygeniertem Tumormodell zu erwarten, zu Beginn ein hypoxischer Gewebeanteil von durchschnittlich 88 % vorhanden. Im zeitlichen Verlauf änderte sich daran nur sehr wenig. Lediglich in der letzten Beobachtungswoche verringert sich die hypoxische Fraktion in der Gruppe 2 (6 x 6 Gy Photonen) auf 68,3 %, in der Gruppe 3 (12 x 3 Gy Photonen) auf 39,7 %. In der Gruppe 1 (6 x 2 Gy Neutronen) nahm der hypoxische Anteil auf annähernd 100 % zum Ende des Versuches hin zu.

6.2.4 Relation des Tumorumfanges zum Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe ohne und mit Bestrahlung

Bei Untersuchungen zur Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks vom Volumen des untersuchten Tumors ergaben sich in der Vergangenheit sehr unterschiedliche Ergebnisse. In einigen Studien konnte dargestellt werden, dass mit einer Zunahme des Tumorumfanges niedrigere Sauerstoffpartialdrücke im Gewebe einhergehen (Vaupel 1989, S. 6449-6465; Terris 1992, S. 153-159; Millross 1997, S. 183-189; Khalil 1995,

S. 297-300). In deutlichem Kontrast hierzu stehen Untersuchungen sowohl an Tumoren von Patienten (Brizel 1997, S. 285-289; Nordmark 1996, S. 31-44), wie auch an transplantierten Tumoren auf Ratten (Yeh 1995, S. 111-114). In diesen Untersuchungen bestand keine Korrelation zwischen der Größe des Tumors und des pO_2 . Zu einem gleichen Ergebnis kamen auch Adam et al. (Adam 1999, S. 171-180) in Versuchen an murinen Tumoren. Ausgehend von diesen differentiellen Ergebnissen scheint eine Abhängigkeit der beiden Größen ganz individuell bei unterschiedlichen Tumorzelllinien vorzuliegen. Es zeigte sich in dieser Arbeit, dass bei den verwendeten Osteosarkomen eine eindeutige Verminderung des pO_2 mit einer Größenzunahme des Tumors einhergeht.

Osteosarkom

Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit ergaben eine deutliche Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks vom Volumen des untersuchten Tumorgewebes bei den unbestrahlten Kontrollgruppen. Es konnte gezeigt werden, dass der Partialdruck kontinuierlich mit zunehmender Größe abnahm.

Thomlinson und Gray (Hall 2000, S. 91-100) machten diese Beobachtung an humanen Bronchialkarzinomen. Sie führten diese auf eine Verringerung der Sauerstoffversorgung im Tumorgewebe zurück, bedingt durch ein rasches Wachstum der Tumormasse bei unzureichender Bereitstellung von versorgenden Kapillargefäßen und somit zu einer zunehmenden Diffusionsstrecke des Sauerstoffs im Gewebe. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde hierzu die Vermutung aufgestellt, dass sich in einem Bereich, der weiter als 70 μm vom Kapillargefäß entfernt ist, Tumorzellen existieren, welche hypoxisch sind und somit einer Radiotherapie gegenüber relativ unempfindlich sind. Es muss jedoch unterschieden werden ob, es sich um eine chronische oder vorübergehende Hypoxie handelt. In nachfolgenden Studien konnte gezeigt werden, dass der Oxygenierungsstatus eines Tumors keine homogene Angelegenheit ist, welche nur von der Verteilung der Kapillaren abhängt, sondern ebenso vom Blutfluss und der Blutverteilung im Tumorgewebe beeinflusst wird (Yamaura 1979, S. 201-219; Brown 1979, S. 650-656). Bei Versuchen mit intravenös verabreichten Lösungen (Chaplin 1989, S. 597-601; Trotter 1989, S. 706-709) und anschließender histologischer Aufarbeitung des Tumorgewebes (Shah-Yukich 1988, S. 236-244) und durch Laser-Doppler-Untersuchungen (Hill 1996, S. 260-263) konnte gezeigt werden, dass sich die Verteilung der Kapillaren im Tumorgewebe sehr inhomogen verhält. Es bilden sich atherio-venöse Shunts aus und der Blutfluss verändert sich innerhalb einer geringen Zeitspanne. Mit der Umverteilung des Blutflusses variiert die Verteilung der hypoxischen Areale. Es muss somit zwischen einer chronischen und einer akuten

Hypoxie unterschieden werden, wobei beide das Ansprechen auf Bestrahlung beeinflussen.

Vergleicht man die mit unterschiedlichen Strahlungsqualitäten und Fraktionierungsschemata behandelten Tumoren dieser Arbeit; ist die enge Verknüpfung von pO_2 und Tumolvolumen aufgehoben. Das Volumen veränderte sich in Abhängigkeit von der Strahlungsqualität und der Einzeldosis in unterschiedlicher Ausprägung. Die Verteilungskurve der ermittelten pO_2 -Werte bewegten sich davon völlig unabhängig.

In einigen Studien, welche das Oxygenierungsverhalten unter Bestrahlung beobachteten, wurde ermittelt, dass unter fraktionierter Bestrahlung eine Reoxygenierung von Tumorgewebe einsetzt (Afzal 1991, S. 473-477; Kallman 1986, S. 681-685; Kitakabu 1991, S. 709-714). Es wurde vermutet, dass dieser Effekt durch Untergang von Gewebe und durch eine Verringerung des Tumolvolumens, mit konsekutiver Verminderung des intratumoralen Gewebedrucks und der Wiedereröffnung von Kapillaren erzeugt wird (Boucher 1990, S. 4478-4484). Wie aus der Abbildung 18 (S. 48) ersichtlich, setzte die Reoxygenierung unter Bestrahlung bei den mit Neutronen behandelten Tumoren früher ein als bei den 6 x 6 Gy Photonen und diese früher als bei den 12 x 3 Gy Photonen. Der Effekt der Bestrahlung auf das Volumen in Bezug auf die Zeit trat bei allen Gruppen annähernd identisch auf. Somit darf vermutet werden, dass die beobachtete Reoxygenierung zumindest nicht alleinig durch den physikalischen Effekt des reduzierten intratumoralen Gewebedrucks bewirkt wird. Wambersie (Wambersie 1990, S. 52-60) postulierte, dass bei der Verwendung von hohen Dosen und Hoch-LET-Strahlung der größere Anteil an Nekrosearealen den Abfall des pO_2 bewirkt. Unsere Ergebnisse widersprechen dieser Annahme, da gerade unter Hoch-LET-Strahlung eine frühere Reoxygenierung eintrat. Identische Beobachtungen bezüglich einer Unabhängigkeit des pO_2 zum Nekroseanteil machte De Jaeger (De Jaeger 1998, S. 717-721) an KHT-C- und SCC-VII-Tumoren.

AT-17-Adenokarzinom

Bei diesem niedrig oxygenierten Tumormodell ergab sich in den unbestrahlten Kontrollgruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum keine signifikante Veränderung des pO_2 in Abhängigkeit zur individuellen Größe des Tumors, obwohl diese Tumoren eine ausgeprägte Wachstumstendenz aufwiesen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Adam et al. (Adam 1999, S. 171-180).

Unter Bestrahlung wurde eine Volumenreduktion erreicht. Ein Einfluss der reduzierten Tumorgröße auf die Oxygenierung ergab sich nicht. Unabhängig von der verwendeten Strahlenentität ist, keine Korrelation zwischen dem pO_2 und dem Volumen des AT-17-Adenokarzinoms zu beobachten. Es kann eine deutliche Tumorschrumpfung unter Bestrahlung verzeichnet werden, Oxygenierungstendenzen und -unterschiede ergeben sich nur aus der verwendeten Strahlungsart oder Einzeldosis.

7 Zusammenfassung

Die Oxygenierung eines Tumors stellt einen bedeutenden prognostischen Faktor in der Behandlung dar. Einerseits wird das lokale Ansprechen eines Tumors auf ein strahlen- und auch chemotherapeutisches Vorgehen wesentlich von der Oxygenierung des Gewebes beeinflusst, andererseits ist die Oxygenierung ein prognostischer Faktor, um Aussagen über die Prädisposition zur Metastasierung machen zu können. Darüber hinaus scheint die Tumorphypoxie eine Progression des Tumors über die Angiogenesis mit Hilfe der Induktion des Proangiogenetik-Proteins z.B. vascular endothelial growth factor zu stimulieren und auch über den Hypoxie-induzierten Transskriptionsfaktor HIF-1, welcher eine wichtige Rolle zu spielen scheint.

Ziel dieser Arbeit war es, das Oxygenierungsverhalten zweier unterschiedlicher Tumoren, einer niedrig, der andere gut oxygeniert, unter fraktionierter Bestrahlung zu untersuchen und herauszufinden, ob durch ein geeignetes Bestrahlungsregime eine Reoxygenierung des Tumorgewebes eintritt.

Bei den zwei verwendeten Tumormodellen handelte es sich einerseits um das auf die balb C-Maus transplantierte Osteosarkom, als Vertreter eines gut oxygenierten Tumors, andererseits um das auf die C3H-Maus transplantierte AT-17-Adenokarzinom, als niedrig oxygeniertes Tumormodell. Diese Tumoren wurden einem vier-armigen Versuchsaufbau zugeführt, wobei die unbestrahlte Kontrollgruppe mit drei bestrahlten Gruppen verglichen wurde. Die Gruppe 1 wurde mit 6×2 Gy Neutronen bestrahlt, die Gruppe 2 mit 6×6 Gy Photonen und die Gruppe 3 mit 12×3 Gy Photonen. Diese vier Gruppen wurden, sowohl während wie auch zwei Wochen nach Bestrahlungsende, in identischer Weise im wöchentlichen Intervall einer Bestimmung des Volumens und einer Messung des medianen pO_2 mittels des Eppendorf-Histogrammen zugeführt.

In den Versuchen konnte herausgearbeitet werden, dass sich unabhängig vom verwendeten Tumormodell unter Neutronen-Bestrahlung die deutlichste Wachstumsverzögerung ergibt und unter 12×3 Gy Photonen die geringste. In Bezug auf die Oxygenierung des Osteosarkoms in Abhängigkeit vom Volumen ergab sich in der Kontrollgruppe eine deutliche Abnahme des mittleren pO_2 bei anwachsendem Volumen. In den bestrahlten Gruppen konnte eine Relation der Oxygenierung zum jeweiligen Tumolvolumen nicht nachgewiesen werden. Beim AT-17-Adenokarzinom verhielt sich der Oxygenierungsstatus unabhängig vom vorliegenden Volumen.

Bei den gut oxygenierten Osteosarkomen kam es unter Bestrahlung zu einer signifikanten Abnahme des pO_2 , gefolgt von einer Phase der Reoxygenierung nach Be-

strahlungsende bis zur fünften Woche des Versuchs. Darüber hinaus wurden aus ethischen Gründen keine Daten erhoben. Im Vergleich war bei der Neutronen-Gruppe der Abfall des mittleren pO_2 deutlicher ausgeprägt als in den anderen beiden Gruppen. Auch war die hypoxische Fraktion des Tumorgewebes höher. Trotz dieses ausgeprägten hypoxischen Verhaltens unter Spaltneutronenbestrahlung kam es nach Ende der Bestrahlung zu einer den anderen beiden Gruppen vergleichbaren Reoxygenierung. In der Gruppe 2 und Gruppe 3 war nach der 1. Woche ebenso ein pO_2 -Abfall aufgetreten, der unter fortgesetzter Bestrahlungsdauer anhielt, anschließend stellt sich auch in diesen Gruppen eine Reoxygenierung ein.

Bei den niedrig oxygenierten Adenokarzinomen konnte unter Neutronenbestrahlung ein Oxygenierungsabfall beobachtet werden. In der Post-Bestrahlungsphase kam es nicht zu einem erneuten Anstieg der medianen pO_2 -Werte in der Gruppe 1, die mit Neutronen bestrahlt worden ist. In der Gruppe 2, die mit 6x6 Gy Photonen bestrahlt wurde und auch in der Gruppe 3, die mit 12x3 Gy Photonen bestrahlt wurde, trat hingegen eine Reoxygenierung in der 5. Beobachtungswoche ein. Unabhängig von der Oxygenierung war dennoch der Volumeneffekt der Neutronenbestrahlung am ausgeprägtesten.

In den Untersuchungen zur hypoxischen Fraktion als prozentualer Anteil der pO_2 -Werte unter 5 mmHg konnte der größte Anteil unter Neutronenbestrahlung beobachtet werden. Schon bei geringer Gesamtdosis stieg der Anteil der hypoxischen Fraktion deutlich höher als bei den beiden Vergleichsgruppen. Dieser Effekt ist sowohl bei den Osteosarkomen wie auch bei den Adenokarzinomen beobachtbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bezüglich der lokalen Tumorkontrolle die Neutronen trotz einer geringeren Gesamtdosis die signifikantesten Ergebnisse liefern. Wie zu erwarten, bewirken sie unabhängig vom jeweiligen Oxygenierungsstatus des Tumors die größte Volumenreduktion und die anhaltendste Volumenverzögerung. Dazu kommt, dass bei gut oxygenierten Tumoren auch unter Neutronen eine Reoxygenierung und eine Verminderung der hypoxischen Fraktion eintritt.

Vergleicht man die bisherigen Studien über die Oxygenierung von Tumoren, sei es als transplantiertes Modell oder humanen Ursprungs, sind sehr differente Ergebnisse erzielt worden. Dies mag seine Ursache in den unterschiedlichen Versuchsaufbauten oder in der Struktur des jeweiligen Tumors haben.

Zukünftig bleibt zu klären, welche Regelmechanismen die Oxygenierung steuern, welche Mechanismen durch die Hypoxie des Tumors in Gang gesetzt werden und letztendlich wie man steuernd in diesen Regelkreis eingreifen kann.

8 Literaturverzeichnis

Statistisches Bundesamt Deutschland, Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen 2003
<http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab3.htm>

U.S. National Institutes of Health, SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002
http://seer.cancer.gov/csr/1973_1999/sections.html#overview, 2002-12-10

Abel, H.; Regel, K.; Rossenbach, H.; Eichhorn, K.; Haberer, G.: Experimentelle Bestimmung des mittleren linearen Energietransfers von Compton-Elektronen in gewebeähnlichen Stoffen als Funktion der primären Quantenenergie, Kernenergie 9 (1966) 57-63

Adam, M. ; Dorie M. J., Brown M.: Oxygen tension measurements of tumor growing in mice, Int. J. Radiat Oncol Biol Phys. 45 (1999) 171-180

Adams, G. E.: The clinical relevance of tumour hypoxia, Eur. J. Cancer, 26 (1991) 420-421

Afzal, S. M. J.; Tenforde, T. S.; Kavanau, K. S.; Curtis, S. B.: Reoxygenation in a rat rhabdomyosarcoma tumor following X-irradiation, Int. J. Radiat. Oncol Biol Phys. 20 (1991) 73-477

Auberger, T.; Reuschel, W.: The role of fast neutrons in the treatment of squamous cell carcinomas of head and neck, the European Experience, Engelhart-Cabillic R, Wambersie A, Fast Neutrons and high – LET Particles in cancer therapie, Springer (1998) 137-147;

Auberger, T.; Reuschel, W.: Reaktor fission neutron therapy in recurrent mammary carcinoma, Kogelnik HD, Progress in Radiooncology, Manduzzi (1997) Vortrag in Bologna

Barendsen, G. W.; Koot, C. J.; van Kersen, G. R.; Bewley, D. K.; Field, S. B.; Parnell, C. J.: The effect of oxygen on impairment of human cells in culture by ionizing radiations of different LET; Int. J. Radiat Biol Phys. 10 (1966) 317-327

Barendsen, G. W.: Proceedings of the Conference on Particle Accelerators in Radiation Therapy, US Atomic Energy Comission, Technical Information Centre, LA-5180-C; October (1972) 120-125

Boucher, Y.; Baxter, L. T.; Jain, R. K.: Intestinal pressure gradiants in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy, Cancer Res. 50 (1990) 4478-4484

Breitner, N.; Kneschaurek, P.; Burger, G.; Huczkowski, J.; Trott, R.: The RBE of fast fission neutrons (2 MeV) for chronic radiation damage of the large bowel of rats after single and fractionated irradiation; Int. J. Radiat. Biol. Relat Stud Phys Chem Med. 49 (1986) 1031-1038

Brizel, D. M.; Scully, S. P.; Harrelson, J. M.: Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcomas, *Cancer Res.* 56 (1996) 941-943

Brizel, M. D.; Sibley, G. S.; Pprosnitz, L. R.: Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and the neck, *Int. J. Radiat Oncol Bio Phys.* 38 (1997) 285-289

Broerse, J. J.; Barendsen, G. W.: Relative biological effectiveness of fast neutrons for effects on normal tissues; *Curr Top Radiat Res Q.* 8 (1973) 305-350 Review.

Brown, J., M.: Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours and possible mechanism of reoxygenation., *British J Radiol.* 52 (1979) 650-656

Chaplin, D. J.; Olive, P. L.; Durand, R. E.: Intermittant blood flow in a murine tumor: radiobiological effects, *Cancer Res* 47 (1989) 597-601

Coutard, H.: Roentgentherapy of epitheliomas of the tonsillar region, hypopharynx and larynx from 1920 to 1926. *Am. J. Roentgenol.* 28 (1932) 313-331

Coutard, H: Principles of x-ray therapy of malignant diseases. *Lancet*, 2 (1934) 1-8

De Jaeger, K.; Merlo, F. M.; Kavanagh, M. C.; Fyles, A. W.; Hedley, D.; Hill, R.: Heterogeneity of tumor oxygenation: relationship to tumor necrosis, tumor size, and metastasis, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 42 (1998) 717-721

Elkind, M.: Repair processes in the treatment and induction of cancer with radiation. *Cancer.* 10 (1990) 2165-2171

Firma Eppendorf, *Bedienerhandbuch* (1995) 5-6

Fleckenstein, W.; Jungblut, J. R.; Suckfüll, M.: Distribution of oxygen pressure in periphery and centre of malignant head and neck tumors. In Ehrly, A. M.; Fleckenstein, W.; Hauss, J.; Huch, R.; *Clinical oxygen pressure measurement II* Berlin: Blackwell Ueberreuter Wiss. (1990) 81-90

Gatenby, R. A.; Kessler, H. B.; Rosenblum, J. S.; Coia, L. R.; Moldofsky, P. J.; Hartz, W. H.; Broder, G. J.: Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 14 (1988) 831-838

Graeber, T. G.; Osmanian, C.; Jacks, T.; Housman, D. E.; Koch, C. J.; Lowe, S. W.; Giaccia, A. J.: Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors, *Nature* 379 (1996) 88-91

Grau, C.; Overgaard, J.: The influence of radiation dose on the magnitude and kinetics of reoxygenation in a C3H mammary carcinoma, *Radiat. Res.* 122 (1990) 309-315

Gray, L. H.; Conger, A. D.; Ebert, M.; Hornsey, S.; Scott, O. C.: Concentration of oxygen dissolved in tissue at the time of irradiation as a factor in radiotherapy, *Br. J. Radiol.* 26 (1953) 638-648

Hall, E. J.: The Physics and Chemistry of Radiation Absorption. In "Radiobiology for the Radiologist", Hall, E. J. (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia-Baltimore-New York-London-Buenos Aires-Hong Kong-Sydney-Tokyo, 2000, 5th edition, chapter I, 5-14

Hall, E. J.: Cell Survival Curves. In "Radiobiology for the Radiologist", Hall, E. J. (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia-Baltimore-New York-London-Buenos Aires-Hong Kong-Sydney-Tokyo, 2000, 5th edition, chapter 3, 32-37

Hall, E. J.: The Oxygen Effect and Reoxygenation. In "Radiobiology for the Radiologist", Hall, E. J. (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia-Baltimore-New York-London-Buenos Aires-Hong Kong-Sydney-Tokyo, 2000, 5th edition, chapter 6, 91-107

Hall, E. J.: Linear Energy Transfer and Relative Biological Effectiveness. In "Radiobiology for the Radiologist", Hall, E. J. (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia-Baltimore-New York-London-Buenos Aires-Hong Kong-Sydney-Tokyo, 2000, 5th edition, chapter 7, 113-119

Höckel, M.; Knoop, C.; Schlenger, K.; Vorndran, B.; Baußmann, E.; Mitze, M.; Knapstein, P. G.; Vaupel, P.: Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiotherapie Oncologie* 26 (1993) 25-50

Hill, S. A.; Pigott, K. H.; Saunders, M. I.; Powell, M. E.; Arnold, S.; Obeid, A.; Ward, G.; Leahy, M.; Hoskin, P. J.; Chaplin, D. J.: Microregional blood flow in murine and human tumours assessed using laser doppler microprobes. *Br. J. Cancer.* 74 (1996) 260-263

Höckel, M.; Schlenger, K.; Aral, B.: Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix; *Cancer Res.* 56 (1996) 4509-4515

Horsman, M. R.; Khalil, A. A.; Sieman, D. W.; Grau, C.; Hill, S. A.; Lynch, E. M.; Chaplin, D. J.; Overgaard, J.: Relationship between radiobiological hypoxia in tumors and electrode measurements of tumor oxygenation, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 29 (1994) 439-442

Kallinowski, F.; Schlenger, K. H.; Kloes, M.; et al.: Tumor blood flow: the principal modulator of oxidative and glycolytic metabolism and the metabolic microenvironment of human tumor xenografts in vivo, *Int. J. Cancer.* 44 (1989) 266- 272

Kallman, R. F.: The phenomenon of reoxygenation and its implications for fractionated radiotherapy. *Radiology.* 105 (1972) 135-142

- Kallman, R. F.; Dorie, M. J.: Tumor oxygenation and reoxygenation during radiation therapy: their importance in predicting tumor response. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 12 (1986) 681-685
- Kaplan, H. S.: Radiobiology's contribution to radiotherapy: Promise or mirage? Failla Memorial Lecture. *Radiat. Res.* 43 (1970) 460-476
- Khalil, A. A.; Horsman, M. R.; Overgaard, J.: The importance of determining necrotic fraction when studying the effect of tumor volume on tissue oxygenation, *Acta Oncol.* 34 (1995) 297-300
- Kitakabu, Y.; Shibamoto, Y.; Sasai, K.; et al.: Variations of the hypoxic fraction in the SCC VII tumors after single dose and during fractionated radiation therapy: assessment without anesthesia or physical resistant of mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 20 (1991) 709-714
- Köster, L.: Applicability of reactor fission neutrons for radiation therapy of cancer. *Nucl. Science Appl.* 2 (1984) 79-96
- Kummermehr, J.; Neuner, M.: Messung der zellulären Überlebensrate im Karzinom AT 17 aufgrund von Mikrokolonien in situ. *Experimentelle Tumorthherapie. Jahresbericht der GSF, München*(1983) 19-24
- Kummermehr, J.; Schraube, H.; Ries, G.; Köster, L.; Hover, K. H.; Blattmann, H.; Stas, P.; Burger, G.: Biological effectiveness of neutrons and pi-mesons in gut, bone, and transplantable tumours. *Strahlenther Onkol.* 165(4) (1989) 276-82
- Kummermehr, J.; Trott, K.R.; Hofmann, R.; Schury, M.: Wachstumsverzögerung des Osteosarkoms OT-S-64 nach Einzeitbestrahlung mit und ohne Misonidazol. *Experimentelle Tumorthherapie. Jahresbericht der GSF, München* (1982) 38-41
- Millross, C. G.; Tucker, S. L.; Mason, K. M.: The effect of tumor size on necrosis and polarographically measured pO₂, *Acta Oncol.* 36 (1997) 183-189
- Mould, R. F.: *A Century of X-rays and Radioactivity in Medicine.* Bristol (1993), England, Institute of Physics Publishing
- Mottram, J. C.: Factors of importance in radiosensitivity of tumors. *Br. J. Radiol.* 9 (1936) 606
- Nordmark, M.; Overgaard, M.; Overgaard, J.: Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and the neck, *Radiother. Oncol.* 41(1996) 31-44
- Palcic, B.; Skarsgard, L. D.: Reduced oxygen enhancement ratio at low doses of ionizing radiation; *Radiat. Res.* 100 (1984) 328-339

Perez, C. A.; Brady, L. W.: Principals and practice of radiation, 3th edition, chapter 2, Lippincott-Raven on CD-ROM

Read, J.: The effect of ionizing radiation on the broad beam root: the dependence of the x-ray sensitivity on dissolved oxygen. Br. J. Radiol. 25 (1952) 89

Reynolds, T. Y.; Rockwell, S.; Glazer, P. M.: Genetic instability induced by the tumor microenvironment, Cancer Res. 56 (1996) 5754-5757

Ries, G.: Habilitationsschrift, Strahlenbiologische Experimente zur relativen Biologischen Wirksamkeit des Spaltneutronenstrahls am Forschungsreaktor der TU-München, München (1985) 9-21

Roentgen, W.C. "On a new kind of rays (preliminary communication)."

Translation of a paper read before the Physikalische-medicinischen Gesellschaft of Würzburg on December 28, 1885. Br. J. Radiol. Vol. 4 (1931) 32

Schramm, U.; Fleckenstein, W.; Weber, C.: Morphological assessment of skeletal muscular injury caused by pO₂ measurements with hypodermic needle probes. In: Ehrly, A. M.; Fleckenstein, W.; Hauss, J.; Huch, R., eds. Clinical oxygen pressure measurements II. Berlin: Blackwell Ueberreuter 1990, 38-50

Shah-Yukich, A. A.; Nelson, A. C.: Characterization of solid tumor microvasculature: a three-dimensional analysis using the polymer casting technique, Lab. Investigation. 58 (1988) 236-244

Swartz, H. M.: Measuring real levels of oxygen in vivo: opportunities and challenges, Biochemical Society Transactions. 30 part 2 (2002) 249

Terris, D.J.; Minchinton, A. I.; Dunphy, E. P.: Computerized histographic oxygen tension measurements of murine tumors, Adv. Exp. Med. Biol. 317 (1992) 153-159

Thomlinson, R. H.; Gray, L. H.: The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy, Br. J. Cancer. 9 (1955) 539-549

Thürriegel, B.: Dissertationsschrift, Messungen des Volumenabhängigkeit und der Oxygenierungseigenschaft verschiedener Tumorentitäten unter Photonen- und Reaktorneutronenstrahlung im randomisierten Tierversuch, München (2006) 38

Trotter, M. J.; Chaplin, D. J.; Olive, P. L.: Use of carbocyanine dye as a marker of functional vasculature in murine tumours, Br. J. Cancer, 59 (1989) 706-709

- Vaupel, P.; Frinak, S.; O' Hara, M.: Direct measurement of reoxygenation in malignant mammary tumors after single large dose of irradiation, *Adv. Exp. Med. Biol.* 180 (1984) 773-782
- Vaupel, P.; Kallinowski, F.; Okunieff, P.: Blood flow, oxygen and nutrient supply and metabolic microenvironment of human tumours; *Cancer Res.* 49 (1989) 6449-6465
- Vaupel, P.; Schlenger, K.; Höckel, M.: Blood flow oxygenation of human tumours; Tumour blood supply and metabolic microenvironment, Fischer (1991) 165-185
- Walenta, S.; Salameh, A.; Lyng, H.; et al.: Correlation of high lactat levels in head and neck tumors with the incidence of metastasis, *Am. J. Pathol.* 150 (1997) 409-415
- Wambersie, A.: Fast neutron therapy at the end of 1988: a survey of the clinical data, *Strahlentherapie Onkologie.* 166 (1990) 52-60
- Weichselbaum, R. R.; Little JB: Radioresistance in some human tumor cells conferred in vitro by repair of potentially lethal x-ray damage. *Radiology.* 145 (1982) 511-513
- Yamaura, H.; Matsuzawa, T.: Tumor regrowth after irradiation: an experimental approach, *Int. J. Radiat. Biol. Phys.* 35 (1979) 201-219
- Yeh, K. A.; Biade, S.; Lanciano, R. M.; et al.: Polarographic needle electrode measurements of oxygen in rat prostate carcinomas: Accuracy and reproducibility, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 33 (1995) 11-114
- Yuan, J. and Glazer, P. M.: Mutagenesis induced by the tumor microenvironment, *Mutant Res.* 400 (1998) 439-446
- Zirkle, R. E.: The radiobiological importance of linear energy transfer, *Radiation Biology*, A. Hollander, ed., Mc. Graw-Hill, N.Y. 1 (1954) pp 315-350;
- Zywietz, F.; Reeker W.; Kochs, E.: Tumoroxygenation in a transplanted rat rhabdomyosarcoma during fractionated irradiation, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 32 [5] (1995) 1391-1400

