

Technische Universität München
Fakultät für Medizin

Effekte der in vivo Röntgen-Mikrostrahltherapie an einer kompakten Strahlenquelle auf humane Hypopharynxkarzinomzellen (FaDu)

Ann-Kristin Porth

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Thomas E. Schmid
2. Priv.-Doz. Dr. Markus Wirth

Die Dissertation wurde am 01.02.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.06.2021 angenommen.

An dieser Stelle möchte ich allen, die mir während der Entstehung meiner Dissertation unterstützend zur Seite standen, meine Dankbarkeit ausdrücken.

Als Erstes danke ich meinem Betreuer, Prof. Dr. Thomas Schmid, für seine wohlwollende Unterstützung und ständige Erreichbarkeit.

Ich bedanke mich bei all denjenigen, die in diesem Forschungsprojekt involviert waren, für die gute Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank gilt Annique Dombrowski, die mir während der Zeit im Labor eine Mentorin war und mir alle relevanten Techniken der Zellkultur geduldig beigebracht hat. Ich danke Marlon Stein, Dr. Karin Burger, Theresa Urban, Fiona Hellmundt und allen anderen, die mir während der Versuche unter die Arme gegriffen haben. Auch möchte ich mich bei meiner Mentorin Dr. Sophie Dobiasch für ihre offene Art und Hilfsbereitschaft bedanken. Mein Dank gilt weiterhin Dr. Stefan Bartzsch, Dr. Helmut Schlattl und Prof. Dr. Jan Wilkens für ihre Unterstützung und ihren Rat während der Bestrahlungen am Klinikum rechts der Isar sowie am Helmholtz Zentrum München.

Überdies danke ich meinen Mitbewohnerinnen Julia Unteregger und Nora Gebhardt für ihre Herzlichkeit, ihr aufrichtiges Interesse und ihre verständnisvolle Art. Ich bedanke mich ebenfalls bei meiner münchener Famiglia sowie meiner Herzensfreundin Anna Raabe für ihre beständige und ehrliche Freundschaft. Ganz besonders möchte ich Geraldine Bihoi danken, die mir immer ein zweites Zuhause gestellt hat.

Ich bin zudem Matthias Valentin Krenn aus tiefsten Herzen dankbar für seine Natürlichkeit und liebevolle Entspantheit, die mir den Mut geben, neue Wege zu gehen.

Abschließend möchte ich mich herzlich bei meiner Familie bedanken, die mir ein immerwährendes Sicherheitsnetz ist. Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Susanne und Karsten Porth, die mich auf allen meinen Wegen bedingungslos und voller Liebe unterstützt haben.

Danke.

Abstract (Deutsch)

Zielsetzung: In dieser Arbeit werden die radiobiologischen Effekte einer Behandlung von FaDu-Tumoren mit Röntgen-Mikrostrahlen untersucht. Das Tumormodell steht stellvertretend für die Tumorentität der Plattenepithel-Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches, welche aufgrund ihrer schlechten Prognose noch immer eine große therapeutische Herausforderung darstellen. Eine Besonderheit der Versuchsreihe ist die Bestrahlung an einer kompakten Strahlenquelle, welche die Erforschung der Röntgen-Mikrostrahltherapie (MRT) ohne die Verwendung von großen Synchrotronanlagen möglich macht. Diese experimentelle Form der Radiotherapie zeichnet sich durch eine räumliche Fraktionierung der Dosis in wenige Mikrometer breite Strahlen aus und konnte mit einem hohen therapeutischen Index bereits großes Potential in der präklinischen Behandlung von intrazerebralen Tumoren zeigen.

Methoden: Die Effekte der MRT wurden sowohl mit denjenigen einer homogenen Bestrahlung verglichen als auch im Vergleich zu nicht bestrahlten Kontrolltumoren analysiert. Als Tumormodell dienten heterotope FaDu-Tumoren in den Ohren von NMRI (nu/nu) Mäusen. Der erste Versuchsteil bestand aus einer in vivo Analyse der Tumorwachstumsverzögerung. Anschließend wurden die Tumorzellen isoliert und mittels Koloniebildungstest (CFA) und Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) auf ihre Strahlensensibilität sowie Chromosomenaberration hin untersucht.

Ergebnisse: Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist Röntgen-Mikrostrahlen an der kompakten Strahlenquelle MuCLS zu erzeugen und für in vivo Bestrahlungen bereitzustellen. Mit dem gewählten Set-up konnte für keinen der zwei Bestrahlungsmodi eine signifikante Wachstumsverzögerung nachgewiesen werden. Auf zellulärer Ebene fand sich kein signifikanter Hinweis auf eine erhöhte Strahlenresistenz nach einer MRT-Behandlung im Vergleich zu einer homogenen Bestrahlung. Translokationen traten nach einer Bestrahlung unabhängig von ihrer Art und Dosis häufiger auf als in der Kontrollgruppe und konnten somit als Marker für den zusätzlichen strahleninduzierten zytogenetischen Schaden angesehen werden.

Fazit: Die Arbeit stellt einen wichtigen Schritt für die MRT-Forschung dar, da sie zeigen konnte, dass es möglich ist, diese vielversprechende Bestrahlungstechnik unabhängig von großen Synchrotronanlagen einzusetzen. Die vorliegenden Ergebnisse können als Ausgangspunkt für zukünftige Forschungskonzepte und impulsgebend für die weitere Optimierung der MRT-Bestrahlungsparameter angesehen werden.

Abstract (English)

Objective: This thesis investigates the radiobiological effects of irradiating FaDu tumors with X-ray microbeams. The chosen tumor model represents human squamous cell carcinomas of the head and neck, a tumor entity which still poses a major therapeutic challenge due to its poor prognosis. A novel aspect of this work is microbeam generation at a compact light source, enabling microbeam irradiation therapy (MRT) research without access to big synchrotron radiation facilities. This experimental form of radiotherapy is characterized by a spatial fractionation of the dose into a few micrometers wide rays. With a high therapeutic index, it already showed great potential in the pre-clinical treatment of intracerebral tumors.

Methods: The effects after MRT were compared to those of homogenous irradiations as well as to non-irradiated control tumors. FaDu tumor cells inoculated into the ears of NMRI (nu/nu) mice served as a heterotopic tumor model. The first part of the study consisted of an in vivo analysis of tumor growth delay. The tumor cells were then isolated enabling further in vitro investigation of their radio sensitivity and chromosomal aberrations using colony formation assay (CFA) and fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques.

Results: The study showed that it is not only possible to generate X-ray microbeams at a compact light source such as the MuCLS but also to provide them for in vivo irradiations. With the chosen set-up no significant growth retardation could be detected for neither of the two irradiation modes. On a cellular level, there was no clear evidence of increased radiation resistance after MRT treatment when compared to a homogeneous irradiation. In comparison with the controls, translocations were observed with a higher frequency after irradiation, regardless of type and dose, and could therefore be considered a measure of additional radiation-induced cytogenetic damage.

Conclusion: This work represents an important step for MRT research as it could show that it is possible to use this promising irradiation technique independently from large synchrotron facilities. The results can be seen as a basis for future research concepts. They provide an orientation for optimizing the irradiation set-up and MRT irradiation parameter.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------|
| Abbildungsverzeichnis | II |
| Tabellenverzeichnis | IV |
| Formelverzeichnis | V |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Kopf-Hals-Tumoren mit Fokus auf dem Hypopharynx-Karzinom | 2 |
| 1.2 Röntgen-Mikrokanalbestrahlung | 7 |
| 2 Problemstellung | 15 |
| 3 Material und Methodik | 19 |
| 3.1 In vivo Studie | 19 |
| 3.1.1 Tumormodell | 19 |
| 3.1.2 Tumorwachstumsverzögerung | 23 |
| 3.2 In vitro Studie | 31 |
| 3.2.1 Isolierung und Kultivierung der FaDu Tumorzellen | 32 |
| 3.2.2 CFA | 37 |
| 3.2.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung | 41 |
| 4 Ergebnisse | 47 |
| 4.1 Tumorwachstumsverzögerung | 47 |
| 4.2 Strahlensensibilität: Klonogenes Überleben nach Bestrahlung in vitro | 53 |
| 4.2.1 CFA-Versuchsreihe 2017 | 55 |
| 4.2.2 CFA-Versuchsreihe 2018 | 65 |
| 4.2.3 Vergleich beider CFA-Versuchsreihen | 73 |
| 4.3 Chromosomenaberrationen | 81 |
| 5 Diskussion | 95 |
| 5.1 Tumorwachstumsverzögerung | 95 |
| 5.2 Strahlensensibilität | 109 |
| 5.3 Chromosomenaberrationen | 118 |
| 5.4 Synopse | 128 |
| 6 Zusammenfassung | 132 |
| Anhang | i |
| Literaturverzeichnis | viii |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 3.1 Positionierung der Mäuse und Tumoren im Versuchsaufbau an der MuCLS | 28 |
| Abbildung 3.2 Heranwachsende Tumoren in den Mäuseohren | 29 |
| Abbildung 3.3 Wachstumskurven der FaDu-Zellen | 35 |
| Abbildung 3.4 Gemittelte Wachstumskurve der FaDu-Zellen | 36 |
| Abbildung 4.1 Tumorwachstumskurven der Kontrollgruppe | 48 |
| Abbildung 4.2 Vergleich der Zeitpunkte des Erreichens des Zielvolumens (T_{V15}) aller Gruppen | 49 |
| Abbildung 4.3 Wachstumskurven der unterschiedlich bestrahlten Tumore | 50 |
| Abbildung 4.4 Vergleich der mittleren Wachstumskurven aller Gruppen | 52 |
| Abbildung 4.5 Mittlere Ausplattierungseffizienzen aller Gruppen in der CFA-Versuchsreihe 2017 | 56 |
| Abbildung 4.6 Histogramme der PE für alle Zelllinien im gruppeninternen Vergleich (CFA-Versuchsreihe 2017) | 57 |
| Abbildung 4.7 Vergleich der Überlebensfraktionen aller Gruppen je Testdosis (CFA-Versuchsreihe 2017) | 59 |
| Abbildung 4.8 Dosisabhängige Überlebenskurven aller Gruppen im Vergleich (CFA-Versuchsreihe 2017) | 63 |
| Abbildung 4.9 Mittlere Ausplattierungseffizienzen aller Gruppen in der CFA-Versuchsreihe 2018 | 65 |
| Abbildung 4.10 Histogramme der PE für alle Zelllinien im gruppeninternen Vergleich (CFA-Versuchsreihe 2018) | 66 |
| Abbildung 4.11 Vergleich der Überlebensfraktionen aller Gruppen je Testdosis (CFA-Versuchsreihe 2018) | 69 |
| Abbildung 4.12 Dosisabhängige Überlebenskurven aller Gruppen im Vergleich (CFA-Versuchsreihe 2018) | 72 |
| Abbildung 4.13 Vergleich der gruppenspezifischen Ausplattierungseffizienzen beider CFA-Versuchsreihen | 74 |
| Abbildung 4.14 Gerätespezifischer Vergleich der SF für die mit 1 Gy und 2 Gy bestrahlten Testplatten beider CFA-Versuchsreihen | 75 |
| Abbildung 4.15 Gerätespezifischer Vergleich der Überlebensfraktionen der mit 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy bestrahlten Testplatten beider CFA-Versuchsreihen | 76 |
| Abbildung 4.16 Gegenüberstellung der Überlebenskurven der Kontrollgruppe aus beiden CFA-Versuchsreihen | 78 |
| Abbildung 4.17 Gegenüberstellung der Überlebenskurven der mittels MRT bestrahlten Gruppen aus beiden CFA-Versuchsreihen | 79 |
| Abbildung 4.18 Gegenüberstellung der Überlebenskurven der homogen bestrahlten Gruppen aus beiden CFA-Versuchsreihen | 80 |
| Abbildung 4.19 Metaphase-Zellkerne der FaDu-Tumorzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop | 84 |
| Abbildung 4.20 Gesamtanzahl der Translokationen pro 100 analysierten Metaphase-Zellkernen | 85 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 4.21 Prozentualer Anteil der verschiedenen Translokationen für alle Versuchsgruppen | 86 |
| Abbildung 4.22 Anzahl der azentrischen Chromosomen in Abhängigkeit von der homogen applizierten Dosis | 88 |
| Abbildung 4.23 Anzahl der azentrischen Chromosomen in Abhängigkeit von der mittels MRT applizierten Dosis | 88 |
| Abbildung 4.24 Anzahl der azentrischen Chromosomen pro Zellkern für alle Versuchsgruppen | 89 |
| Abbildung 4.25 Prozentualer Anteil der verschiedenen azentrischen Chromosomen für alle Gruppen | 90 |
| Abbildung 4.26 Anzahl der Trisomien pro 100 analysierten Metaphase-Zellkernen | 92 |
| Abbildung 4.27 Anzahl der Monosomien pro 100 analysierten Metaphase-Zellkernen | 92 |
| Abbildung 4.28 Anzahl der Insertionen pro 100 analysierten Metaphase-Zellkernen | 93 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 4.1 Anzahl der Tumoren die in die Analyse der Wachstumsverzögerung eingeschlossen werden konnten eingeschlossen werden konnten | 47 |
| Tabelle 4.2 Anzahl der Zelllinien und Koloniebildungstests die in die Analysen von PE und SF eingeschlossen werden konnten. | 54 |
| Tabelle 4.3 Anzahl der Zelllinien und CFA die in die Analyse der Daten aus der Versuchsreihe 2017 eingeschlossen werden konnten | 58 |
| Tabelle 4.4 Teststatistiken der einfaktoriellen Varianzanalysen bezüglich der unterschiedlichen Überlebensfraktionen in der Versuchsreihe 2017 | 60 |
| Tabelle 4.5 Übersicht über die statistisch signifikanten Ergebnisse der Post-hoc-Analysen bezüglich der Unterschiede der SF zwischen den Versuchsgruppen (CFA-Versuchsreihe 2017) | 61 |
| Tabelle 4.6 Sensibilitätskoeffizienten α und β für alle Versuchsgruppen (CFA-Versuchsreihe 2017) | 64 |
| Tabelle 4.7 Anzahl der Zelllinien und CFA die in die Analyse der Daten aus der Versuchsreihe 2018 eingeschlossen werden konnten | 68 |
| Tabelle 4.8 Teststatistiken der einfaktoriellen Varianzanalysen bezüglich der unterschiedlichen Überlebensfraktionen der CFA-Versuchsreihe 2018 | 70 |
| Tabelle 4.9 Übersicht über die statistisch signifikanten Ergebnisse der Post-hoc-Analysen bezüglich der Unterschiede der Überlebensfraktionen zwischen den Versuchsgruppen (CFA-Versuchsreihe 2018) | 71 |
| Tabelle 4.10 Sensibilitätskoeffizienten α und β für alle Versuchsgruppen (CFA-Versuchsreihe 2018) | 73 |
| Tabelle 4.11 Überblick über die statistisch signifikanten Unterschiede der Überlebensfraktionen zwischen den CFA welche am <i>Gulmay</i> beziehungsweise am <i>Xstrahl</i> durchgeführt wurden für ausgewählte Versuchsgruppen | 77 |
| Tabelle 4.12 Anzahl der Zelllinien und Metaphase-Zellkerne die in die FISH-Analyse eingeschlossen werden konnten | 83 |

Formelverzeichnis

| | | |
|-------------|---|----|
| Formel 3.1 | $V = \frac{\pi}{6} * L * B * H$ Elliptisches Tumolvolumen | 30 |
| Formel 3.2 | $V_{rel,x} = \frac{V_{Dx}}{V_{D0}}$ Relatives Tumolvolumen | 30 |
| Formel 3.3 | $f(x) = \alpha * e^{\beta * x}$ Exponentielles Tumorwachstum der Kontrollen | 31 |
| Formel 3.4 | $T_d = T_{V15X} - T_{V15K}$ Tumorwachstumsverzögerung | 32 |
| Formel 3.5 | $N = X * \frac{2}{4} * 10^4$ Zellzahlberechnung (Neubauer Zählkammer) | 35 |
| Formel 3.6 | $V = \frac{N_W * 50ml}{N}$ Volumen Zellsuspension für Wachstumskurve | 36 |
| Formel 3.7 | $T_D = \frac{\ln(2)}{\ln(N_t) - \ln(N_0)} * t$ Verdopplungszeit <i>FaDu</i> Zellen | 37 |
| Formel 3.8 | $V = \frac{6.400 \text{ Zellen/ml} * 30ml}{N}$ Volumen Zellsuspension für CFA | 38 |
| Formel 3.9 | $PE_x = \frac{N_k}{N_z} * 100$ Ausplattierungseffizienz (CFA) | 40 |
| Formel 3.10 | $SF_X = \frac{PE_X}{PE_0}$ Überlebensfraktion (CFA) | 40 |
| Formel 3.11 | $S = e^{-(\alpha * D + \beta * D^2)}$ Regressionsformal Zellüberleben (CFA) | 41 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| AF | Azentrisches (Chromosomen-)Fragment |
| AFN | <i>Kombination aus Atipamezole, Flumazenil und Naloxon (Narkose-Antagonisten)</i> |
| AJCC | <i>American Joint Committee on Cancer</i> |
| CF | <i>Zusammengesetztes chromosomales Fragment</i> |
| CFA | <i>Koloniebildungstest</i> |
| CLS | <i>Kompakte Strahlenquelle</i> |
| CNT | <i>Kohlenstoffnanoröhren-Technik</i> |
| DAPI | <i>4',6-Diamidino-2-Phenylindol</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DNA | <i>Desoxyribonukleinsäure</i> |
| DSB | <i>Doppelstrangbruch</i> |
| EGFR | <i>Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor</i> |
| ESRF | <i>European Synchrotron Radiation Facility</i> |
| FCS | <i>Fetales Kälberserum</i> |
| FISH | <i>Fluoreszenz in situ Hybridisierung</i> |
| HNSCC | <i>Plattenepithel-Karzinom des Kopf-Hals-Bereiches</i> |
| HPV | <i>Humanes Papillomavirus</i> |
| IC | <i>Inkomplettes (di-)zentrisches Chromosom</i> |
| ICE | <i>Inkomplettes chromosomales Element</i> |
| ICS | <i>Inverse Compton-Streuung</i> |
| IRR | <i>Induzierte Strahlenresistenz</i> |
| KG | <i>Körpergewicht</i> |
| LDR | <i>Niedrigstrahlung</i> |
| LFXT | <i>Röntgenröhre mit Linienfokus</i> |
| LINAC | <i>Linearbeschleuniger</i> |
| MMF | <i>Kombinationsanästhesie aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl</i> |
| MRT | <i>Röntgen-Mikrokanalbestrahlung</i> |
| MSB | <i>Munich School of BioEngineering</i> |
| MuCLS | <i>Munich Compact Light Source</i> |
| NCCN | <i>National Comprehensive Cancer Network</i> |
| PBS | <i>Phosphat-gepufferte Salzlösung</i> |
| PE | <i>Ausplattierungseffizienz</i> |
| PVDR | <i>Verhältnis von Peak- und Vally-Dosis (peak-to-valley dose ratio)</i> |
| SF | <i>Überlebensrate</i> |
| TF | <i>Terminales chromosomales Fragment</i> |
| UICC | <i>Union for International Cancer Control</i> |
| WCP | <i>Whole chromosomal painting probes</i> |
| WHO | <i>Weltgesundheitsorganisation</i> |

1 Einleitung

Die Röntgen-Mikrokanalbestrahlung (MRT) ist eine experimentelle Form der Radiotherapie, welche eine räumlich fraktionierte Dosisverteilung aufweist und in präklinischen Studien bereits vielversprechende Ergebnisse erzielen konnte. Verschiedene Untersuchungen an unterschiedlichen Tumormodellen konnten sowohl eine präzise Tumorkontrolle als auch ein geringeres Nebenwirkungsprofil als unter konventionellen homogenen Bestrahlungen feststellen. Im Fokus der Forschung stehen bis heute infantile Hirntumoren. Eine Ausweitung des potentiellen Anwendungsgebietes auf weitere Tumorarten, die, ähnlich wie die zerebralen Neoplasien, aufgrund ihrer Lagebeziehungen zu vitalen Strukturen schwierig zu therapieren sind und eine schlechte Prognose haben, erscheint sinnvoll. In diese Kategorie fallen beispielsweise Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches, wie das Hypopharynx-Karzinom. Obwohl die Wirksamkeit der Röntgen-Mikrokanalbestrahlung schon in zahlreichen präklinischen Studien gezeigt werden konnte, sind ihre strahlenbiologischen Eigenschaften noch nicht ausreichend bekannt. Es lassen sich nur wenige Ergebnisse zu den zellulären und molekularen Mechanismen finden, welche der Wirkung der MRT zu Grunde liegen und sie von der konventionellen homogenen Radiotherapie unterscheiden. Zudem wird diese neuartige Bestrahlungsform bis zum heutigen Zeitpunkt hauptsächlich an großen Synchrotronanlagen erzeugt, da diese in der Lage sind die notwendigen, quasi parallelen Röntgenstrahlen mit hohen Dosisraten zu produzieren.

Im Rahmen meiner medizinischen Doktorarbeit wurde die Wirkung von Röntgen-Mikrokanälen, welche an einer neuen kompakten Strahlenquelle erzeugt wurden, anhand eines heterotopen Tumormodells von humanen Hypopharynx-Karzinomzellen in Nacktmäusen untersucht. Vergleichend mit einer homogenen Röntgenbestrahlung, wurden sowohl das Wachstumsverhalten nach der Therapie *in vivo*, als auch die anschließende Strahlensensibilität der Tumorzellen sowie chromosomale Veränderungen *in vitro* analysiert. Ziel war es, die qualitative Übereinstimmung der an dieser innovativen Bestrahlungseinheit generierten MRT mit den konventionellen Synchrotronbestrahlungen zu untersuchen. Dieser Vergleich sollte einen Beitrag zum weiteren Verständnis dieser neuen Bestrahlungsform sowie zu ihrer klinischen Implementierung leisten. Im Folgenden findet sich ein Überblick über die Epidemiologie sowie die aktuelle Therapie und Prognose von Kopf-Hals-Tumoren mit besonderem Fokus auf dem Hypopharynx-Karzinom, sowie weiters eine Zusammenfassung des aktuellen Wissensstands in Hinblick auf die Wirkungsweise von Röntgen-Mikrokanälen in präklinischen Tumormodellen.

1.1 Kopf-Hals-Tumoren mit Fokus auf dem Hypopharynx-Karzinom

Krebserkrankungen zählen zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Dabei haben sie in einigen Ländern mit hohem *Human Development Index*¹ die kardiovaskulären Erkrankungen als die führende Ursache eines vorzeitigen Todes² überholt (Wild et al., 2020). Weltweit verstarben 2018 insgesamt etwa 9,6 Millionen Menschen an ihrer Tumorerkrankung. Damit war einer von sechs Todesfällen durch Krebs bedingt (WHO, 2018 und IARC, 2018). Schätzungsweise erkranken einer von acht Männern und eine von zehn Frauen im Laufe ihres Lebens an Krebs. Die Inzidenz von Tumorerkrankungen ist steigend: 2008 wurden weltweit noch 12,7 Millionen neue Fälle verzeichnet, während es 2012 schon 14,1 Millionen und 2018 bereits über 17 Millionen Fälle waren (Stewart & Wild, 2014 und IARC, 2018). Es wird geschätzt, dass im Jahr 2040 die Inzidenz von Tumorerkrankungen weltweit 27 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr überschreiten wird (Wild et al., 2020). Diese hohen Zahlen lassen erkennen, dass zusätzlich zu den persönlichen Schicksalen auch die gesellschaftlichen und ökonomischen Auswirkungen von Krebserkrankungen zunehmen. Die Kosten für Patient*innen mit Tumorerkrankungen betragen weltweit jährlich etwa 1,16 Billionen US-Dollar (WHO, 2018 und Wild et al., 2020).

Obwohl es einige Krebsformen gibt, die, besonders wenn sie im Frühstadium entdeckt werden, gut therapierbar sind, existieren noch immer Tumoren, welche eine sehr schlechte Prognose aufweisen. Hierzu zählen unter anderen die Kopf-Hals-Tumoren und besonders auch das Hypopharynx-Karzinom. Gründe hierfür liegen vor allem in den Eigenschaften der Neoplasien selbst, wie auch in ihren Lagebeziehungen zu vitalen Strukturen, welche den Erfolg der Therapie einschränken können.

Epidemiologie der Kopf-Hals-Tumoren mit Fokus auf dem Hypopharynx-Karzinom

Tumoren im Kopf-Hals Bereich gehen meist von den Plattenepithelzellen der Schleimhäute des oberen Aerodigestivtraktes aus. Zu ihnen zählen Neoplasien der Mundhöhle, der Nase und Nasennebenhöhlen, des Kehlkopfes, sowie des Rachens. Letzteren ist auch das Hypopharynx-Karzinom zuzuordnen (Wild et al., 2020 und Pfister et al., 2020). Weltweit liegen Kopf-Hals-Tumoren an siebter Stelle sowohl der häufigsten Tumorneuerkrankungen als auch der durch Krebs herbeigeführten Todesfälle. In der männlichen Bevölkerung stellen sie sogar die

¹ Der *Human Development Index* ist ein zusammenfassendes Maß für die durchschnittliche Leistung in Schlüsseldimensionen der menschlichen Entwicklung: ein langes und gesundes Leben, Bildung und ein angemessener Lebensstandard (Human Development Index, o.D.).

² Tod im Alter zwischen 30 und 69 Jahren

fünfhäufigste Krebserkrankung dar. Das Verhältnis der Inzidenz zwischen Männern und Frauen beträgt etwa 3 : 1. Im Jahr 2018 gab es weltweit fast 900.000 neue Fälle und über 450.000 Menschen verstarben an einem Kopf-Hals-Tumor. Das Hypopharynx-Karzinom zählt mit einem Anteil von etwa 10 % zu den eher selteneren Neoplasien des Kopf-Hals-Bereiches (IARC, 2018 und Wild et al., 2020). Aus Daten der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) geht hervor, dass im Jahr 2018 weltweit 80.608 Menschen an einem Hypopharynx-Karzinom erkrankten. Die Mortalität der Erkrankung ist hoch: weltweit verstarben an ihren Folgen im selben Jahr fast 35.000 Menschen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 63 und 66 Jahren. Es erkranken deutlich mehr Männer als Frauen: das Verhältnis der geschlechterspezifischen Inzidenz liegt bei etwa 5 : 1 (IARC, 2018). Dies lässt sich zum Teil durch die Risikofaktoren der Erkrankung erklären, zu denen besonders der Konsum von Tabakwaren sowie von Alkohol zählt. Da diese Noxen den gesamten oberen Aerodigestivtrakt betreffen, liegen häufig sekundäre Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches, der Lunge oder des Ösophagus vor. Einen weiteren Risikofaktor stellen chronische Infektionen mit humanen Papillomaviren (HPV) dar. Weiters wird eine genetische Prädisposition für Kopf-Hals-Tumoren vermutet, da zum Teil eine familiäre Häufung an Fällen beobachtet werden konnte. Auch eine schlechte Mundhygiene kann das Entstehen bestimmter Kopf-Hals-Tumoren begünstigen (Stewart & Wild, 2014, Wild et al., 2020, Zentrum für Krebsregistrierdaten, 2019 und Pfister et al., 2020).

Therapie und Prognose

Die Prognose des Hypopharynx-Karzinoms ist noch immer schlecht. Das liegt vor allem einerseits an der anatomischen Lage der Tumoren, welche der Region zwischen der Spitze des Kehldeckels (Epiglottis) und der Unterkante des laryngealen Ringknorpels (Cartilago cricoidea) entspringen und somit eine enge Lagebeziehung zu vitalen Strukturen aufweisen, welche für den natürlichen Schluckakt und die Atmung verantwortlich sind. Andererseits wird der Krankheitsverlauf dadurch beeinflusst, dass die Mehrheit der Tumoren erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird. Mehrere retrospektive Analysen aus unterschiedlichen Ländern zeigen, dass sich zwischen 66 % und 94 % der Hypopharynx-Karzinome bei Erstdiagnose bereits im Stadium III oder IV nach der Stadieneinteilung des *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) und der *Union for International Cancer Control* (UICC)³ befinden (Gatta et al., 2015, Pracy et al., 2016, Sewnaik et al., 2005, Lefebvre et al.,

³ Ein Überblick über die prognostische Einteilung der Tumorstadien nach AJCC/UICC findet sich im Anhang (Tabelle A.2).

1996, Hall et al., 2008, Shah et al., 1976, Chen et al., 2008, Bova et al., 2005 und Edge et al., 2010). Das Stadium der Krebserkrankung konnte, neben patient*innenspezifischen Faktoren, wie Alter, dem Vorhandensein von Komorbiditäten und dem funktionellen Status der *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG)⁴, als einer der wichtigsten prognostischen Faktoren in Bezug auf das Überleben identifiziert werden (Kim et al., 2001 und Kuo et al., 2016). Die allgemeine 5-Jahres-Überlebensrate lag für lokalisierte Tumoren der Stadien I und II zwischen 40 % und 60 %. Für regionale Tumoren, beziehungsweise Tumoren des Stadiums III, wurden Raten zwischen 19 % und 38 % gesehen. Bei bereits vorhandenen Fernmetastasen, entsprechend einem Stadium IV, sank der Anteil der nach 5 Jahren noch Lebenden auf nurmehr 4 – 17 % (Pracy et al., 2016, Shah et al., 1976, Chen et al., 2008, Newman et al., 2015 und Gatta et al., 2015). Retrospektive Studien zeigten weiterhin, dass das mittlere Überleben von Patient*innen mit Hypopharynx-Karzinom nur zwischen 25 und 44 Monaten lag (Lefebvre et al., 2012 und Kim et al., 2001). Für Patient*innen mit Fernmetastasen betrug es weniger als zwölf Monate (Takes et al., 2012) und für diejenigen, die weder eine kurative noch eine palliative Therapie erhielten, nur ca. sechs (Sewnaik et al., 2005). Obwohl es innerhalb der letzten Jahrzehnte viele technische Weiterentwicklungen sowohl innerhalb der Bildgebung als auch in den verschiedenen onkologischen Therapiemodalitäten gab, hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate für Hypopharynx-Karzinom-Patient*innen seit den letzten drei Jahrzehnten nur wenig verbessert. Seit 1999 stieg sie um nur etwa 5 – 9 Prozentpunkte (Gatta et al., 2015, Newman et al., 2015 und Kuo et al., 2016).

Die Therapie des Hypopharynx-Karzinoms richtet sich nach den *NCCN Guidelines Head and Neck Cancers* des *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (Pfister et al., 2020). Sie besteht aus drei Säulen: der Chirurgie, der Radiotherapie sowie der Chemotherapie und orientiert sich am Tumorstatus sowie dem klinischen Stadium der Erkrankung⁵, welche durch das Staging vor Therapiebeginn festgelegt werden. Allgemein kann zwischen organerhaltenden und nicht-organerhaltenden Therapieansätzen unterschieden werden, wobei erstere das Ziel verfolgen den Larynx und den Pharynx sowohl anatomisch als auch funktionell intakt zu lassen. Für kleine, lokal begrenzte Tumoren kann häufig ein monomodaler und organerhaltender Therapieansatz verfolgt werden. Dies kann entweder eine definitive Radiotherapie oder eine

⁴ Der ECOG Performance Status ist ein weit verbreitetes Instrument, um den funktionellen Status von Krebspatient*innen zu evaluieren und zu beschreiben, in welchem Maß die Krankheit sie im Alltag einschränkt (ECOG Performance Status, o.D.).

⁵ Die Klassifizierung der Tumoren folgt der 8. Version der TNM-Klassifikation des AJCC von 2017, was für tumor-node-metastasis steht und die Größe beziehungsweise Ausdehnung des Tumors, das Vorhandensein und die Verteilung von Lymphknotenmetastasen sowie das Vorliegen von Fernmetastasen evaluiert. Ein Überblick findet sich gemeinsam mit den prognostischen Tumorstadien im Anhang (Tabelle A.1).

offen chirurgische oder endoskopisch transorale Resektion des Tumors sein. Regional fortgeschrittene Tumoren werden meist mit einer Kombination mehrerer Therapiemodalitäten behandelt. Betroffene Patient*innen können primär chirurgisch therapiert werden, wobei der Larynx und der Pharynx entweder teilweise oder vollständig entfernt werden, man spricht von einer totalen oder partiellen Laryngektomie, beziehungsweise Pharyngektomie. Der chirurgischen Resektion folgt in den meisten Fällen eine postoperative Radiotherapie. Alternativ können auch nicht-chirurgische, potentiell organerhaltende Therapieansätze bestehend aus einer Kombination von Radio- und Chemotherapie zum Einsatz kommen. Die Behandlung besteht meist aus mehreren Zyklen einer Chemotherapie im Abstand von mehreren Wochen, zwischen denen die Bestrahlungen stattfinden. Die richtige Auswahl der Therapie gestaltet sich mitunter schwierig, da sie von vielen Faktoren abhängig ist und sich bis jetzt in klinischen Studien noch keine Therapieoption in Hinblick auf das Überleben und die Tumorkontrolle als den anderen überlegen zeigen konnte (Petersen et al., 2018, Pracy et al., 2016, Kuo et al., 2016, Kim et al., 2001 und Lefebvre et al., 2012). Schätzungsweise kommen 25 % der Patient*innen mit Hypopharynx-Karzinom jedoch nicht für eine kurative Therapie infrage. Eine Rolle spielen hierbei ihr Alter, die Ausdehnung des Tumors, Fernmetastasen, Komorbiditäten oder das Ablehnen einer operativen Therapie. Für sie gibt es, vorrangig zur Linderung ihrer Symptome, die Möglichkeiten einer palliativen Chemotherapie, einer palliativen Bestrahlung oder Maßnahmen der *best supportive care* (Pracy et al., 2016). Mehr als die Hälfte der Patient*innen, die in kurativer Absicht behandelt werden, entwickelt nach Abschluss der Therapie ein Tumorrezidiv, welches sich meist innerhalb von 1 – 1,5 Jahren nach Abschluss der Therapie manifestiert (Pracy et al., 2016, Hall et al., 2008, Tsou et al., 2007 und Kim et al., 2001). Das Voranschreiten der Erkrankung führt dazu, dass im weiteren Krankheitsverlauf etwa zwei Drittel dieser Patient*innen ebenfalls auf eine palliative Therapie umgestellt werden müssen (Gourin & Terris, 2004).

Unabhängig vom eingesetzten Therapieverfahren erleben Überlebende Einschränkungen in den Bereichen der Kommunikation, der Ernährung, des psychosozialen Lebens und der Sexualität. Die psychische Belastung, die durch die Erkrankung selbst und ihre Therapie entsteht, kann zu einer depressiven Episode führen (Mahalingam & Spielmann, 2019 und Sewnaik & Battenberg de Jong, 2019). Die Suizidrate liegt für Kopf-Hals-Tumor-Patient*innen bei mehr als dem Dreifachen der Normalbevölkerung. Für Patient*innen mit der Diagnose eines Hypopharynx-Karzinoms ist sie besonders stark erhöht und beträgt fast das Zwölfwache der Selbstmordrate der Normalbevölkerung. Die meisten Suizide passieren innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung (Kam et al., 2015).

Seit Anfang der 1990er Jahre werden mit dem Ziel des Organerhalts vermehrt nicht-chirurgische Therapien angewandt (Shah et al., 1976, Lefebvre et al., 1996, Petersen et al., 2018, Hall et al., 2008, Kim et al., 2001, Newman et al., 2015, Tsou et al., 2007 und Kuo et al., 2016). So werden mittlerweile etwa 73 % der Patient*innen mit lokal begrenzten Tumoren und 43 % derer in fortgeschrittenen Krankheitsstadien bestrahlt. Der Einsatz einer Radiochemotherapie liegt für Tumoren der frühen Stadien bei ca. 20 %. Bei fortgeschrittenen Tumoren liegt er bei 38 % (Petersen et al., 2018). Ziel der nicht-chirurgischen Therapieansätze ist es, den funktionellen Status und die Lebensqualität der Patient*innen zu verbessern ohne das onkologische Ergebnis zu kompromittieren (El-Deiry et al., 2005). Hierbei gilt es, besonders durch Erhalt des Kehlkopfes, die natürliche Stimmbildung, sowie das normale Atmen und Schlucken zu bewahren. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine larynx-erhaltende Therapie, bei ähnlicher Tumorkontrolle und vergleichbaren Überlebensraten wie bei einem primär operativen Eingriff, nach zehn Jahren für mehr als die Hälfte der Patient*innen, die noch am Leben waren, der Kehlkopf erhalten werden konnte. Die krankheitsspezifischen Überlebensraten mit intaktem Kehlkopf betragen nach fünf und zehn Jahren jeweils 40,5 % und 27 % (Lefebvre et al., 2012). Die intensivierten Radio- und Chemotherapien bedingen jedoch einen Anstieg der Toxizität und damit der Therapienebenwirkungen (Eerenstein et al., 2019 und Hawkins et al., 2017). Diese entstehen häufig durch akute, subakute und chronische Strahlenschäden des umliegenden Gewebes. Zu den strahlensensiblen Risikostrukturen zählen hierbei neuronale Strukturen, wie das Gehirn, der Hirnstamm, das Rückenmark, die Cochlea, die Bogengänge, das Chiasma opticum, die Hirnnerven, die Retina und der Plexus brachialis sowie die Tränendrüsen, die Cornea, die Schleimhäute des oberen Aerodigestivtraktes, die Speicheldrüsen, die Knochen der Schädelbasis und der Mandibula, die Schlundmuskulatur und der Larynx. Komplexe strahleninduzierte Gewebereaktionen beinhalten Mukositis und Desquamation mit der Ausbildung von Ödemen, Erythemen, Nekrosen und Ulzerationen (King et al., 2016). Alle Betroffenen berichteten von Odynophagie und 96 % von Schmerzen, die auch unabhängig vom Schlucken persistierten (Wong et al., 2006). Durch die Bestrahlung kommt es weiters zu einer Abnahme der Speichelproduktion mit erhöhter Viskosität des Sekrets. Eine permanente Xerostomie kann die Folge sein und Veränderungen von Stimme und Geschmack sowie Schwierigkeiten beim Kauen und Schlucken hervorrufen, sowie Fissuren, Ulzerationen und Zahnprobleme, wie Karies und dentoalveoläre Infektionen begünstigen (Epstein et al., 2001 und Eisbruch et al., 2003). Das Zusammenspiel aus Mukositis und zähem Speichel kann eine Dysphagie hervorrufen und die Nahrungsaufnahme behindern, was die künstliche

Ernährung über eine nasogastrale oder PEG-Sonde⁶ notwendig machen kann (Sewnaik & Battenberg de Jong, 2019). Ungefähr 15 % der Hypopharynx-Karzinom-Patient*innen bleiben von einer PEG-Sonde abhängig (Pracy et al., 2016 und Eerenstein et al., 2019). Langzeitfolgen können außerdem Strikturen oder Stenosen und eine strahleninduzierte Neuropathie mit muskulären und nervalen Dysfunktionen sein (King et al., 2016). Eine weitere nicht zu vernachlässigende Therapiefolge sind sekundäre Malignome im Bestrahlungsfeld. Diese therapie-assoziierten Zweittumoren entstehen durch fehlerhafte Reparaturen strahleninduzierter subletaler DNA-Schäden, welche zu einer erhöhten Rate an Mutationen und einer neoplastischen Transformation der entsprechenden Zellen führen können (Santivasi & Xia, 2014 und Behjati et al., 2016) Insgesamt 8 % aller sekundärer Tumoren konnten den Langzeitfolgen einer Strahlentherapie zugeordnet werden (Berrington de Gonzalez et al., 2011). Auch Tumorrezidive, welche beispielsweise durch eine Selektion strahlenresistenter Tumorzellen begünstigt werden können, stellen allgemein eine große Herausforderung in der Radiotherapie dar (Kuwahara et al., 2018). Für 74 % aller Kopf-Hals-Tumor-Patient*innen wird mindestens einmal im Verlauf ihrer Therapie eine strahlentherapeutische Behandlung empfohlen. Für Patient*innen mit Karzinomen des Hypopharynx und Larynx, sowie des Oro- und Nasopharynx liegt diese Empfehlung sogar bei 100 % (Delaney et al., 2005). Verbesserungen der Bestrahlungstechnik, sowohl in Hinblick auf ihre Nebenwirkungen als auch bezüglich einer effektiven Tumorkontrolle, kämen also den meisten Patient*innen mit Hypopharynx-Karzinom, und ebenfalls denjenigen mit anderen Kopf-Hals-Tumoren, zugute.

Ein Ansatz liegt in der präziseren Applikation der ionisierenden Strahlen, welche die volumetrischen Dosen, die den Larynx und den Pharynx, die Speicheldrüsen, sowie weitere Risikostrukturen erreichen, minimieren würde. Neben der bereits eingesetzten Partikeltherapie, welche zur Bestrahlung Protonen oder Kohlenstoffionen nutzt und so die an das Normalgewebe abgegebene Dosis noch weiter reduzieren und Risikostrukturen schützen kann, scheint auch die in dieser Arbeit eingesetzte Röntgen-Mikrokanalbestrahlung in diesem Hinblick viel Potential zu haben.

1.2 Röntgen-Mikrokanalbestrahlung

Die Röntgen-Mikrokanalbestrahlung, oder auch Röntgen-Mikrostrahl-Bestrahlungs-Therapie (*Microbeam Radiation Therapy*, MRT), ist eine präklinische Weiterentwicklung der Therapie mit Röntgenstrahlen, deren Entstehung auf Wilhelm Conrad Röntgens Beschreibungen aus dem

⁶ Die perkutane endoskopische Gastrostomie (PEG) ermöglicht, durch einen Zugang von außen über die Bauchdecke in den Magen, eine künstliche Ernährung direkt über den Gastrointestinaltrakt.

Jahr 1896 zurückgeht. Die MRT basiert auf dem Konzept der räumlichen Dosisfraktionierung (*spatially-fractionated radiotherapy*, SFRT) und knüpft damit einerseits an die räumlich-fraktionierte Gittertherapie (*spatially-fractionated grid therapy*, GRID) an, welche erstmals 1999 durch Mohiuddin et al. beschrieben wurde und auf einer Idee von Alban Köhler (1909) beruhte. Andererseits folgt sie dem Prinzip der stereotaktischen Radiochirurgie (*stereotactic body radiation therapy*, SBRT), eine Methode, bei der eine hohe Einzeldosis hoch konform aus unterschiedlichen Richtungen an das Zielvolumen abgegeben wird. Diese wird hauptsächlich als non-invasive Technik zur Ablation von intrakraniellen Läsionen eingesetzt (Leksell, 1983 und Sims et al., 1999). Die Intention dahinter ist es, den Dosis-Volumen-Effekt⁷ optimal auszunutzen und, wie die konforme Radiotherapie (CRT), die ionisierenden Strahlen präzise an das Tumorgewebe abzugeben und dabei die Dosis, welche das angrenzende Normalgewebe erreicht, so gering wie möglich zu halten (Lichter & Lawrence, 1995 und Fass, 1998).

In der Standardtherapie von Kopf-Hals-Tumoren kommen derzeit die Intensitäts-beziehungsweise Volumen-Intensität-modulierte Therapie (*intensity modulated radiotherapy*, IMRT bzw. *volumetric-modulated arc therapy*, VMAT), sowie die 3D konforme Radiotherapie (3DCRT) zum Einsatz, welche in zeitlich fraktionierten Bestrahlungsplänen Anwendung finden. Die Therapiedauer liegt hier bei etwa sechs bis sieben Wochen (Pfister et al., 2020). Mit der MRT könnte es möglich werden, eine weitere Therapiemodalität in die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren aufzunehmen, deren Vorteile zum einen in einer einmaligen Bestrahlung mit hohen Dosen und zum Anderen in einer noch präziseren Dosisapplikation mit besserem Nebenwirkungsprofil liegen würden. Schon Mohiuddin et al. (1999) konnten zeigen, dass 93,3 % der Kopf-Hals-Tumoren auf die von ihnen getestete Form der Radiotherapie ansprachen, welche kleine „Bleistiftstrahlen“ (*pencil beams*) mit einem 1 : 1-Verhältnis von bestrahltem und abgeschirmtem Gewebe im Bestrahlungsfeld nutzte, sodass das Gewebe zwischen den eigentlichen Strahlengängen nur etwa 25 – 30 % der applizierten Dosis erreichte.

Grundlagen der Röntgen-Mikrokanalbestrahlung

Bei der Röntgen-Mikrostrahltherapie erreichen sehr hohe Einzeldosen innerhalb sehr schmaler Strahlenkanäle in festgelegten Abständen das Zielvolumen. Die Entwicklung der Technik geht auf Versuche in den 1950er Jahren zurück, welche die Auswirkung kosmischer Strahlung auf den menschlichen Organismus im Weltall untersuchen sollten. Hierbei zeigte sich, dass das

⁷ Der Dosis-Volumen-Effekt besagt, dass die von einem Gewebe tolerierte Dosis nicht nur von dessen Struktur und der Radiosensitivität seiner Zellen abhängig ist, sondern auch maßgeblich von dem Gewebivolumen bestimmt wird, welches durch die ionisierenden Strahlen getroffen wird (Withers et al. 1988a). Die für die Tumorkontrolle notwendige Dosis wird durch die Toxizität im Normalgewebe limitiert.

Hirngewebe von Mäusen Dosen von über 10.000 Gy, die mittels einem 25 μm schmalen Strahl aus 22 MeV Deuteronen abgegeben wurden, tolerierte. Es zeigte sich, dass die Schwellendosis, die einen Gewebeschaden auslöste, mehrere 100 Gy betrug. Sie lag damit erheblich höher, als für > 0.5 mm breite ionisierende Strahlen, welche in der konventionellen Strahlentherapie eingesetzt werden (Zeman et al., 1959 und Curtis, 1963). Bis heute werden zur Erzeugung der nur wenige Mikrometer messenden Strahlen große Synchrotronanlagen benötigt, da an ihnen zum einen hoch brillante monochromatische Röntgenstrahlen über breite Energiebereiche erzeugt sowie zum anderen extrem hohe Dosisraten erreicht werden können, welche für die präzise Strahlkollimierung notwendig sind (Thomlinson et al., 2000 und De Felici et al., 2005). Beides ist essenziell, um das Zielgewebe innerhalb Bruchteilen einer Sekunde mit hohen Dosen bestrahlen zu können. Nur so ist es möglich die Präzision der Mikrokanäle selbst bei kleinsten Bewegungen des zu bestrahlenden Organismus, die beispielsweise durch Atmung und Herzschlag entstehen, aufrecht zu erhalten (Bräuer-Krisch et al., 2003). Seit den 1990er Jahren werden Studien zur MRT hauptsächlich sowohl an der *National Synchrotron Light Source* des *Brookhaven National Laboratory* in New York als auch an der Synchrotronquelle der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) in Grenoble durchgeführt (Slatkin et al., 1992, Slatkin et al., 1995, Laissue et al., 1998 und Bravin et al., 2015). 1994 wurde die Technik von Slatkin et al. patentiert. Die durch Multilamellenkollimatoren erzeugten quasi-parallelen mikroplanaren Strahlen sind charakteristischerweise zwischen 25 μm und 50 μm breit sowie etwa 1 cm hoch und liegen in einem Abstand von etwa 200 μm (50 – 400 μm) zueinander. Zu den die MRT definierenden Größen zählen die Dosis innerhalb der Mikrokanäle, die sogenannte Peak-Dosis, welche mehrere Hektogray betragen kann, sowie die Dosis in den dazwischen gelegenen Abschnitten, die sogenannte Valley-Dosis (Slatkin et al., 1995, Laissue et al., 1999, Dilmanian et al., 2005 und Serduc et al., 2006). Diese wird je nach Abstand vom Zentrum des Mikrokanals durch verschiedene gestreute Partikel ausgemacht. In erster Linie entsteht sie durch Photonen aus dem Effekt der Compton-Streuung. Innerhalb der Transitionszone, direkt lateral des eigentlichen Strahlengangs, welche durch einen steilen Dosisabfall charakterisiert ist, wird die Dosis hauptsächlich von Photoelektronen übermittelt. Die Valley-Dosis sollte eine bestimmte Schwelle nicht überschreiten, um eine effiziente Gewebereparatur zu gewährleisten (Bräuer-Krisch et al., 2005 und Siegbahn et al., 2006). Noch wichtiger als die absoluten Größen der Peak- und Valley-Dosen ist jedoch ihr Verhältnis zueinander, das sogenannte *peak-to-valley dose ratio* (PVDR), da mit ihm die Größe des strahleninduzierten Schadens korreliert (De Felici et al., 2005). Weiterhin einflussnehmend auf die Strahlenwirkung im Gewebe ist die Steilheit des Dosisabfalls, beziehungsweise die Breite

der Transitionszone zwischen Peak- und Valley-Dosis (Bräuer-Krisch et al., 2003 und Blattmann et al., 2005).

In mehreren präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die besondere räumlich fraktionierte Dosisverteilung der Röntgen-Mikrostrahltherapie einen hohen therapeutischen Index mit einer erstaunlichen Toleranz des Normalgewebes sowie einer adäquaten Tumorkontrolle aufweist (Dilmanian et al., 2005). Sie scheint damit großes Potential für eine neue klinische Radiotherapiemethode zu bieten. Die genauen Mechanismen ihrer Wirkung im Gewebe sind noch nicht vollständig verstanden und bedürfen noch genauerer Erforschung. Der aktuelle Wissensstand bezüglich der radiobiologischen Effekte der MRT ist im nächsten Abschnitt zusammengefasst.

Gewebeschonende und tumorablative Effekte der Röntgen-Mikrokanalbestrahlung

Normales Gewebe tolerierte in präklinischen Versuchen MRT-Einzeldosen von mehreren hundert bis tausend Gray. Die meisten Daten hierzu gibt es zu neuronalem Gewebe von Ratten und Mäusen (Slatkin et al., 1995, Laissue et al., 1998, Laissue et al., 1999 und Dilmanian et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass erst eine Dosis von 2.000 Gy in einer bestrahlten Hemisphäre von Rattengehirnen zu einem Zellkern- und Perikaryaverlust der Neurone und Astrozyten führte. Nekrosen konnten bei einer Peak-Dosis von 10.000 Gy beobachtet werden (Slatkin et al., 1995). Die Haut ist bei der Bestrahlung durch Röntgen-Mikrostrahlen aufgrund der niedrigen Energie der Photonen und ihrer geringen Eindringtiefe extrem hohen Dosen ausgesetzt. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass auch sie eine äußerst hohe Toleranz gegenüber einer Bestrahlung mit Röntgen-Mikrokanälen aufwies und erst Dosen von über 1.000 Gy kutane Nekrosen induzierten (Renier et al., 2002 und Zhong et al., 2003). Die komplexen biologischen Mechanismen, die für die Wirkung von Röntgen-Mikrokanälen verantwortlich sind und zu der erstaunlich hohen Toleranz von Organen und Geweben führen, sind noch nicht ausreichend verstanden, hängen jedoch von der besonderen Form ihrer Dosisverteilung ab (De Felici et al., 2005). Histologische Analysen von mit MRT bestrahlten Geweben zeigten ein Muster aus Streifen, welche den Strahlengängen der Mikrokanäle entsprachen und dem lokalisierten Absterben von Zellen in diesen Regionen zugeschrieben werden konnten (Dilmanian et al., 2005 und Serduc et al., 2006). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die räumlich fraktionierte Dosisverteilung zu einer konzentrierten Zerstörung von Zellen im Bereich der Peak-Regionen führt, während die Schäden in den Valley-Regionen subletal bleiben und die, in ihnen gelegenen Zellen, ihre Funktionalität und ihre regenerativen Fähigkeiten behalten. Die Gewebeabschnitte zwischen den

Strahlengängen der Mikrokanäle können demnach als Zell-Reservoir angesehen werden, welches den Ausgangspunkt von Reparaturmechanismen darstellt (Smyth et al., 2016 und Laissue et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass der gewebeschonende Charakter der MRT verloren ging, sobald der Abstand der Mikrostrahlen weniger als das Doppelte ihrer Breite betrug (Dilmanian et al., 2002). Näherte sich die Valley-Dosis, welche maßgeblich durch die Abstände der Mikrostrahlen zueinander beeinflusst wird, der gewebespezifischen Toleranzdosis gegenüber konventionell applizierten Röntgenstrahlen an, verlor sich der Effekt ebenfalls. Die Valley-Dosis scheint somit der ausschlaggebende Faktor für die Antwort des Normalgewebes auf eine Bestrahlung mit Röntgen-Mikrostrahlen zu sein. Sie sollte nicht jene Dosis überschreiten, welche das Gewebe, normalerweise, bei konventioneller Bestrahlung, tolerieren würde (Laissue et al., 2013). Zusätzlich zu diesem typischen Dosis-Volumen-Effekt ließen einige Studien auf einen spezifischen biologischen Effekt der Mikrokanalbestrahlung schließen. Wurde die, über die insgesamt bestrahlte Fläche, integrierte Dosis bei Mikrokanalbestrahlung mit konventionell applizierten Dosen verglichen, so lag die vom Normalgewebe tolerierte maximale Dosis bei der Bestrahlung mit Röntgen-Mikrokanälen um ein 4,2-faches höher (Dilmanian et al., 2002). Ein häufig beschriebener Aspekt dieses MRT-spezifischen biologischen Effektes ist ihre Wirkung auf das Gefäßnetz. Besonders kapilläre Gefäße aber auch größere Arterien zeigten eine schnelle Regeneration durch überlebende klonogene Endothelzellen in den Valley-Regionen. Kleine Arterien tolerierten sogar durch Mikrostrahlen applizierte Dosen von bis zu 2.000 Gy ohne, dass es zu Okklusionen kam (Dilmanian et al., 2003a, Dilmanian et al., 2005, Peña et al., 2003, Serduc et al., 2006 und Van der Sanden et al., 2010). Der Transitionszone, welche zwischen Peak- und Valley-Regionen gelegen ist, kommt hierbei eine wichtige Rolle zuteil. In Monte Carlo-Simulationen konnte ein Dosisabfall von 80 % auf 20 % im Abstand von 9 μm zum Mikrokanal gezeigt werden, eine Strecke, die in der Größenordnung des Durchmessers einer Zelle und innerhalb der Reichweite der Zellsignalisierung liegt. Es ist demnach vorstellbar, dass sowohl Vorläuferzellen als auch bestimmte Botenstoffe, die Gewebsabschnitte erreichen, welche durch die Peak-Dosen im direkten Strahlengang geschädigt wurden und zu deren Regeneration beitragen (Dilmanian et al., 2006, Dilmanian et al., 2007 und Laissue et al., 2013). Dies käme einem sogenannten Bystander-Effekt gleich, einem Phänomen, welches beschreibt, dass als Folge einer Signalübertragung von bestrahlten Zellen auch nicht direkt bestrahlte Zellen auf eine Radiotherapie reagieren können (Heeran et al., 2019). Ähnlich wie das Kapillarnetz, zeigten auch neuronales Gewebe und die Epidermis der Haut eine durch überlebende klonogene Zellen vermittelte Regenerationsfähigkeit (Dilmanian et al., 2005 und Zhong et al., 2003).

Neben der Wirkung von Röntgen-Mikrostrahlen auf normales Gewebe, wurde auch ihre Effizienz in der Behandlung von Malignomen in mehreren präklinischen Studien untersucht. In Tierversuchen konnten, besonders für intrakranielle Tumoren sowie auch für Mamma- und Plattenepithel-Karzinome, sowohl palliative als auch kurative Effekte nachgewiesen werden. Die meisten Studien bezogen sich auf das 9L-Gliosarkom bei Ratten und Mäusen (Laissue et al., 1998, Dilmanian et al., 2002, Dilmanian et al., 2003b, Serduc et al., 2006, Smilowitz et al., 2006, Regnard et al., 2008, Serduc et al., 2008 Serduc et al., 2009 und Bouchet et al., 2010). Weitere Studien untersuchten die Wirkung auf das F98-Gliom in Ratten (Bouchet et al., 2016a), auf murine EMT6- und 67NR-Mamma-Karzinome (Dilmanian et al., 2003c und Crosbie et al., 2010) sowie auf das, subkutan in Mäuse implantierte, murine SCCVII-Plattenepithel-Karzinom (Miura et al., 2006). Für alle Tumormodelle konnte, nach der Bestrahlung mit Röntgen-Mikrokanälen, ein längeres mittleres Überleben der Versuchstiere beobachtet werden. Beispielsweise überlebten Ratten mit 9L-Gliosarkomen nach einer MRT-Behandlung im Vergleich zu unbestrahlten Kontrolltieren durchschnittlich bis zu 150 Tage länger (Laissue et al., 1998 und Dilmanian et al., 2002). Eine MRT führte überdies zu einem verlangsamten Wachstum sowohl von 9L-Gliosarkomen in Ratten als auch von murinen Mamma-Karzinomen (Laissue et al., 1998 und Crosbie et al., 2010). Ein Großteil, der mit Röntgen-Mikrokanälen bestrahlten Neoplasien konnte sogar abladiert werden. Für die subkutan in Mäuse implantierten EMT6-Mamma-Karzinome konnte mit Peak-Dosen zwischen 410 Gy und 650 Gy eine Tumorablationsrate von etwa 50 – 60 % beobachtet werden (Dilmanian et al., 2003c). Eine Peak-Dosis von 625 Gy führte auch bei 50 % der bestrahlten 9L-Gliosarkomen von Ratten zu einer lokalen Kontrolle (Smilowitz et al., 2006).

Zu den spezifischen toxischen Effekten der Röntgen-Mikrostrahlen auf Tumoren tragen nach heutigem Wissen unterschiedliche Mechanismen bei. Zum einen konnte eine zytoreduktive Wirkung gezeigt werden (Serduc et al., 2008). Bei 9L-Gliosarkomen in Ratten führte die räumlich fraktionierte Bestrahlung beispielsweise zu einer höheren Zelltodrate und einer stärkeren Aktivierung von Immunzellen als eine konventionelle Radiotherapie (Bouchet et al., 2016b). Zum anderen konnte der tumorablative Effekt auf eine Schädigung und unzulängliche Reparatur der Blutgefäße innerhalb des Tumors zurückgeführt werden, welche eine unzureichende Perfusion der Neoplasie und damit das konsekutive Absterben der Tumorzellen zur Folge hätte (Dilmanian et al., 2002). Weiters wurde für räumlich fraktionierte bestrahltes neoplastisches Gewebes ein Phänomen beobachtet, welches die inadäquate regenerationsfähige Kapazität der Tumoren nach Mikrokanalbestrahlungen erklären könnte und welches die Forscher*innen als Waschmaschinen-Effekt bezeichneten: durch eine hohe migratorische

Aktivität der Tumorzellen, hatten sich maximal bestrahlte Zellen aus den Peak-Regionen und minimal bestrahlte Zellen aus den Valley-Regionen nach 24 Stunden vollständig durchmischt, sodass das normalerweise nach einer Mikrokanalbestrahlung im Gewebe entstehende typische Streifenmuster aufgelöst war (Crosbie et al., 2010). Zusätzlich konnten, genau wie für den gewebeschonenden Effekt der MRT, auch für ihre antitumorale Wirkung Bystander-Effekte beschrieben werden. Zu ihnen zählten unter anderem antitumorigene proteomische Veränderungen (Smith et al., 2013) und eine veränderte Genexpression, die zu immunmodulatorischen Prozessen und einer frühen inflammatorischen Reaktion führten (Sprung et al., 2012 und Bouchet et al., 2013).

Es konnte gezeigt werden, dass das Zusammenwirken des gewebeschonenden sowie des tumorablativen Effektes der Röntgen-Mikrostrahl-Bestrahlungs-Therapie zu einem um mindestens 2,5- bis 5-fach höheren therapeutischen Index führt, als ihn eine konventionelle Röntgenbestrahlung aufweist (Dilmanian et al., 2002). In vitro Versuche, die das klonogene Überleben von EMT6,5ch-Zellen analysierten, ließen darauf schließen, dass eine Mikrostrahl Peak-Dosis von 112 Gy strahlenbiologisch einer homogen applizierten Dosis von etwa 5 Gy entspricht (Ibahim et al., 2014).

Alternative Strahlenquellen: Translation der MRT in die klinische Anwendung

Der bisherige Wissensstand deutet darauf hin, dass die Röntgen-Mikrokanalbestrahlung großes Potenzial für den Einsatz als eine neue präzise Form der Radiotherapie mit hohen Bestrahlungsdosen birgt. Für die Translation der Röntgen-Mikrokanalbestrahlung in die klinische Radiotherapie sind noch ausführlichere Daten zur Toxizität im normalen Gewebe, ein besseres Verständnis der zytoreduktiven Mechanismen sowie fundierte Angaben zur Tiefendosis-Verteilung und zu den Langzeiteffekten der neuartigen Bestrahlungsform nötig (Smyth et al., 2016 und Wright, 2015). Hierfür sind auch Versuche mit tiefer gelegenen Tumoren und größeren Versuchstieren von erheblicher Relevanz (Grotzer et al., 2015). Zusätzlich sollte die Erforschung der Effektivität von Röntgen-Mikrostrahlen auf weitere Tumorentitäten ausgeweitet werden, um mit einem Nachweis des potentiellen Nutzens der Technik für eine große Anzahl von Krebspatient*innen die langwierige und kostenintensive Produktentwicklung zu rechtfertigen (Wright, 2015). Technische Weiterentwicklungen, die eine hochkonforme bildgesteuerte Bestrahlung mit Mikrokanälen ermöglichen, wären ebenfalls wichtige Schritte, um die MRT als effektive klinische Malignomtherapie zu etablieren (Bouchet et al., 2010). Hierbei ist es von wesentlichem Interesse die MRT-Forschung außerhalb der großen Synchrotronanlagen für einen größeren wissenschaftlichen Kreis zugänglich zu machen. Dies

kann durch alternative kompakte und kostengünstigere Strahlenquellen gelingen, welche Versuche in universitären und industriellen Laboratorien ermöglichen und so den Erkenntnisfortschritt vorantreiben würden. Für diese existieren bereits mehrere Konzepte und Prototypen. An der *University of North Carolina* wurde beispielsweise eine kompakte Röntgen-Mikrokanal-Bestrahlungseinheit basierend auf der Kohlenstoffnanoröhren-Technik (CNT) entwickelt, an der bereits erfolgreich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Bestrahlungen durchgeführt werden konnten (Schreiber & Chang, 2012, Hadsell et al., 2013 und Zhang et al., 2014). Weiterhin wird an der Entwicklung alternativer Strahlenquellen geforscht, welche einerseits konventionelle Röntgenröhren einsetzen oder andererseits auf speziellen Röntgenröhren mit Linienfokus (*line focus x-ray tube*, LFXT) basieren (Bartzsch et al., 2016 und Bartzsch & Oelfke, 2017). Eine weitere, vielversprechende Alternative sind kompakte Strahlenquellen (*compact light source*, CLS), welche Röntgenstrahlen durch inverse Compton-Streuung (ICS) von niedrig-energetischen Laser-generierten Photonen an hoch-energetischen Elektronen erzeugen. Solche CLS basieren entweder auf einem Linearbeschleuniger (LINAC) oder auf einem Mini-Synchrotron mit Elektronenspeicherring. Sie haben, mit einem Durchmesser von nur wenigen Metern, eine kleinere Grundfläche und sind weitaus kostengünstiger als große Synchrotronanlagen. Die erste kommerziell erhältliche kompakte Strahlenquelle ist die *Lyncean CLS* von *Lyncean Technologies* in Kalifornien, welche aus einem Forschungsprojekt des *National Accelerator Laboratory*, am *Stanford Linear Accelerator Center* (SLAC), und der *Stanford University* hervorging (Loewen, 2003, Achterhold et al., 2013 und Lyncean Technologies Inc., 2020). Am 29.10.2015 wurde eine solche Anlage erstmalig unter dem Namen *Munich Compact Light Source* (MuCLS) an der *Munich School of BioEngineering* (MSB) in Garching offiziell in Betrieb genommen. Sie ist Teil des *Center for Advanced Laser Applications* (CALA), einem gemeinsamen Projekt der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) und der Technischen Universität München (TUM), und ermöglicht wichtige biomedizinische Forschungsarbeit. Zu dieser zählen auch die Anfang 2017 durchgeführten Röntgen-Mikrokanalbestrahlungen, welche Grundlage der vorliegenden medizinischen Dissertation waren.

2 Problemstellung

Bei der Untersuchung neuer onkologischer Therapiemethoden soll deren Erfolg mit demjenigen schon bestehender Therapien verglichen werden. Zur Analyse des Therapieerfolgs zählt zum einen die erreichte Tumorkontrolle, welche für die Heilung der Betroffenen essenziell ist. Zum anderen spielen auch die durch die Therapie entstehenden Nebenwirkungen eine entscheidende Rolle, da sie die Lebensqualität der Patient*innen deutlich einschränken können. Besonders Tumorentitäten, deren Diagnose noch immer mit einer schlechten Prognose einhergeht, bedürfen der Entwicklung neuer Therapieansätze. Hierzu zählen unter anderem die Kopf-Hals-Tumoren, deren Therapie durch die komplexen Lagebeziehungen zu vitalen Strukturen in dieser Region erschwert wird. Um eine experimentelle Therapiemethode, wie die hier untersuchte Röntgen-Mikrokanalbestrahlung, aus der präklinischen Forschung in die klinische Anwendung zu überführen, ist es wichtig die biologischen Mechanismen, welche zu den beobachteten Effekten führen, zu identifizieren. Der präklinischen radiobiologischen Forschung stehen hierfür sowohl gut etablierte zellkulturelle *in vitro* Methoden als auch *in vivo* Tumormodelle zur Verfügung, welche häufig aus humanen Xenograft-Tumoren bestehen (Burdach et al., 1993). Für den Vergleich der Effektivität unterschiedlicher Therapietechniken ist es sinnvoll und üblich eine Dosisabhängigkeit, beispielsweise in Form einer Dosis-Wirkungs-Kurve, zu dokumentieren (Denekamp, 1980).

In vivo bietet sich für die Analyse der durch die Bestrahlung erreichten Tumorregression das Bestimmen einer Wachstumsverzögerung der Tumoren an. Hierbei werden die Tumoren regelmäßig vermessen, ihre Größe dokumentiert und der zeitliche Unterschied bis zum Erreichen einer vorher definierten Zielgröße bestimmt. Vorteile dieser Technik sind ihre einfache Umsetzung, die wenig an technischer Ausstattung voraussetzt, sowie die Möglichkeit eine große Variationsbreite von Wirkungen auf den Tumor aufzuzeichnen. Zu den radiobiologischen Effekten, welche das Tumorwachstum verlangsamen, zählen einerseits direkte strahleninduzierte Schäden der Tumorzellen, sowie der sogenannte Tumorbett-Effekt, welcher auf stromale und vaskuläre Schäden zurückzuführen ist, die die Proliferation der überlebenden Tumorzellen ebenfalls beeinträchtigen (Begg, 1980).

In vitro kann mithilfe von Zellkulturen besonders der durch die Bestrahlung entstandene zytotoxische Effekt untersucht werden. Dieser entsteht einerseits durch die direkte Einwirkung der Strahlen auf die DNA der Zellen, welche zu Doppelstrangbrüchen (DSB) führt. Andererseits wird er durch die Bildung freier Radikale vermittelt, welche ebenfalls schädigend auf die DNA einwirken (Santivasi & Xia, 2014). Die Wirkung ionisierender Strahlen auf

zellulärer Ebene kann auf unterschiedliche Arten analysiert werden. Die ermittelte relative biologische Effektivität der untersuchten Therapie kann von den Beobachtungen, die in vivo gemacht wurden, abweichen, da ausschließlich der direkte durch die Strahlung induzierte Zellschaden, ohne die Einflüsse des Tumorbetts, beurteilt wird (Thomlinson & Craddock, 1967, Begg, 1980 und Denekamp, 1980). Ein Maß der zytotoxischen Wirkung ionisierender Strahlen ist das klonogene Zellüberleben, welches mithilfe des Koloniebildungstests (*colony formation assay*, CFA) evaluiert werden kann. Er erfasst die proliferative Kapazität jeder einzelnen bestrahlten Zelle, die auch als klonogenes Überleben bezeichnet wird. Aus jeder Zelle mit intakter proliferativer Kapazität entwickeln sich Klone in Form von Zellkolonien. Eine Anzahl von 50 Tochterzellen gilt hierbei als sicheres Indiz für die erhaltene Klonogenität der Ursprungszelle. Die Behandlung einer Zellpopulation mit ionisierenden Strahlen, führt dazu, dass ein Teil der Zellen ihre Fähigkeit der Teilung verliert. Dies wird als klonogener Zelltod verstanden und kann sowohl Folge der mitotischen Katastrophe als auch des programmierten Zelltods sein. Die Größe des Anteils an Zellen, welche ihre Teilung einstellen, ist dabei abhängig von der applizierten Strahlendosis und kann als Maß für die Strahlensensibilität der Zellpopulation interpretiert werden. Führt man Koloniezählungen für unterschiedlich hohe applizierte Strahlendosen aus, lassen sich die Daten graphisch als Überlebenskurve darstellen (Puck & Marcus, 1955). Ein Vorteil des CFA ist es, dass er alle Formen des Zelltods erfasst. Auch wird durch ihn ein strahleninduzierter transienter Wachstumsstopp nicht als zytotoxischer Effekt fehlinterpretiert. Diese Vorteile haben den CFA zum Goldstandard für die Quantifizierung der Radisosensitivität von Zellen in vitro werden lassen (Kahn et al., 2012). Wichtige Parameter der Analyse stellen die Ausplattierungseffizienz (*plating efficiency*, PE) sowie die Fraktion der überlebenden Zellen (*surviving fraction*, SF) dar. Die PE bezeichnet den prozentualen Anteil der ausgesäten Zellen, aus denen, innerhalb eines definierten Zeitraums, eine sichtbare Kolonie entstanden ist. Ionisierende Strahlen führen zu einer Suppression der Koloniebildung, was sich als reduzierte PE zeigt und ein Maß für den strahleninduzierten Schaden darstellt. Die SF ist, definitionsgemäß, das Verhältnis von der Anzahl der nach einer Bestrahlung tatsächlich ausgebildeten Kolonien zu der PE, die eine Zellpopulation ohne Behandlung aufweist. Sie lässt somit auf die Strahlensensibilität der untersuchten Zellen schließen (Franken et al., 2006).

Ein weiteres, molekularbiologisches Maß für die zytotoxische Wirkung ionisierender Strahlen sind chromosomale Veränderungen der bestrahlten Zellen. Diese entstehen durch die fehlerhafte Reparatur der strahleninduzierten DBS. Zu den häufigen Reparaturfehlern zählen neben Translokationen, Deletionen und Duplikationen (Allan & Travis, 2005 und Santivasi &

Xia, 2014) auch azentrische Chromosomen (Wu et al., 1997). Veränderungen dieser Art können mithilfe der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) untersucht werden. Diese molekularzytogenetische Technik basiert darauf, spezielle Gensequenzen zu lokalisieren und sichtbar zu machen und ermöglicht es, chromosomale Strukturen zu evaluieren. Eine gängige Methode ist das Verwenden von Sonden, welche aus Nukleinsäure-Sequenzen bestehen, die mit fluoreszierenden Molekülen, sogenannten Fluorochromen, verknüpft sind. Diese binden direkt an spezifische homologe DNA-Sequenzen und machen sie somit sichtbar. Um die dynamische Reaktion zwischen dem zellulären Erbgut und den entsprechenden Sonden zu ermöglichen, muss die DNA von Interphase- oder Metaphase-Chromosomen denaturiert als Einzelstrang vorliegen. Denn in dieser Form kann die komplementäre, ebenfalls einzelsträngige Sonde mit ihr ein stabiles doppelsträngiges Hybrid-Molekül bilden. Die Technik geht auf eine 1980 von Baumann et al. beschriebene Methode zurück, welche seitdem vielfach weiterentwickelt wurde. Es können beispielsweise mehrere vollständige Chromosomen auch zeitgleich visualisiert werden. Die hierfür eingesetzten Sonden werden als *whole chromosomal painting probes* (WCP) bezeichnet und sind mit Fluorochromen unterschiedlicher Spektren markiert, sodass die verschiedenen Chromosomen in unterschiedlichen Farben zur Darstellung kommen. DNA-Abschnitte, welche nicht die Zielsequenz enthalten, können zusätzlich, mithilfe einer sogenannten Gegenfärbung, visualisiert werden. Hierfür eignen sich aromatische Diamidine, wie 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI). Auch werden zusätzlich Agenzien eingesetzt, welche die Intensität der Photonenemission der Fluorochrome verlängern können (*antifade agents*). Eine FISH mit WCP macht es möglich sowohl numerische als auch strukturelle stabile Aberrationen, wie Translokationen und Insertionen, mit hoher Sensitivität und Spezifität, einfach und präzise zu quantifizieren. Dies kann für Toxizitätsstudien, im Rahmen der radiobiologischen Forschung, eingesetzt werden, um eine Beziehung zwischen der Applikation von ionisierenden Strahlen und konsekutiven chromosomalen Aberrationen herzustellen. (Gray et al., 1992, Swinger & Tucker, 1996, Ried et al., 1998, Levisky & Singer, 2003 und Lakatošová & Holečková, 2007). Die Effizienz des Detektierens von strukturellen Aberrationen nimmt zu, bis 50 % des Genoms angefärbt sind. Translokationen sind ohne festes Muster über alle Chromosomen verteilt, sodass es nicht explizit eine Rolle spielt, welche Chromosomen markiert werden. Es erscheint jedoch sinnvoll, wenige große anstelle von vielen kleinen Chromosomen zu untersuchen. Hierfür eignen sich besonders die größeren Chromosomen eins bis vier (Lucas et al. 1992 zitiert in Gray et al. 1992).

Im Rahmen meiner medizinischen Doktorarbeit habe ich die biologischen Effekte von Röntgen-Mikrokanalstrahlen, welche an der kompakten Röntgenquelle MuCLS erzeugt wurden, sowohl

in vivo als auch in vitro untersucht. Als Tumormodell dienten humane Hypopharynx-Karzinom Zellen der Ziellinie FaDu, welche heterotop in den Ohren von Nacktmäusen heranwuchsen. An ihnen wurde die radiobiologische Wirkung der Bestrahlung als Ganzes im Sinne einer Wachstumsverzögerung evaluiert. Dies geschah sowohl im Vergleich zu unbehandelten Tumoren als auch zu konventionell homogen bestrahlten Tumoren. Neben vaskulären und Bystander-Effekten wird auch ein direkter zytotoxischer Effekt für die biologische Wirksamkeit der MRT verantwortlich gemacht. Für eine weiterreichende Analyse dieser Wirkung, wurden die Tumorzellen, im Anschluss an die in vivo Studie, isoliert und zurück in die Zellkultur überführt. Mittels Koloniebildungstests wurde das klonogene Zellüberleben als Maß für die Strahlensensibilität der unterschiedlich bestrahlten FaDu-Tumorzellen verglichen. Weiters wurde die Technik der Fluoreszenz in situ Hybridisierung eingesetzt, um den zytogenetischen Schaden nach der Bestrahlung mit Röntgen-Mikrostrahlen zu quantifizieren.

Die Untersuchungen sollten einerseits dazu dienen, das potentielle klinische Einsatzgebiet der Röntgen-Mikrostrahltechnik auf die Entität der Kopf-Hals-Tumoren auszuweiten. Andererseits bestand die Intention das Verständnis der Wirkweise von Röntgen-Mikrostrahlen im Gewebe zu erweitern. Hierbei lag ein besonderer Fokus auf der Rolle der zytotoxischen Wirkung und auf ihrem Anteil an der biologischen Effektivität der MRT. Überdies sollte die erfolgreiche Erzeugung dieser räumlich fraktionierten Strahlung an einer kompakten Synchrotronquelle dokumentiert werden, da sie einen wichtigen Schritt für die weitere Erforschung und zukünftige Translation der MRT darstellt.

3 Material und Methodik

3.1 In vivo Studie

Die therapeutische Wirkung einer Bestrahlung mit Röntgen-Mikrokanälen wurde in vivo anhand der Wachstumsverzögerung eines heterotopen Tumormodells aus Hypopharynx-Karzinom Zellen in immundefizienten Nacktmäusen untersucht. Verglichen wurde die MRT hierbei zum einen mit einer konventionellen homogenen Bestrahlung sowie zum anderen mit einer „Schein-Bestrahlung“, welche als Kontrolle diente. Der Vorteil der in vivo Studie gegenüber den, an der MuCLS bereits erfolgten, in vitro Studien lag unter anderem darin, dass die Effekte der ionisierenden Strahlen nicht nur auf zellulärer Ebene beobachtet wurden, sondern ihre Auswirkungen auf den Tumor, als komplexe histologische Struktur mit einem Stroma und Gefäßnetz, untersucht werden konnten. Die Methode der Heterotransplantation von humanen malignen Tumoren in thymusaplastische Mäuse (*“Nude”*) wurde, als Technik in der onkologischen Forschung, erstmals 1969 durch Rygaard und Povlsen beschrieben. Ein heterotopes Tumormodell bietet mehrere Vorteile. Einerseits können die Neoplasien bestrahlt werden, ohne vitale Strukturen der Versuchstiere durch die ionisierenden Strahlen zu gefährden. So werden die Auswirkungen der Behandlung auf den allgemeinen Gesundheitszustand der Tiere möglichst klein gehalten. Andererseits sind sowohl die Implantation als auch das Vermessen der Tumoren relativ einfach durchführbar (Kahn et al., 2012 und Rygaard & Povlsen, 1969).

Die Studie wurde durch die zuständige Stelle der Regierung von Oberbayern genehmigt (Referenznummer 55.2.1.54-2532-62-2016, NTP-ID 00009166-1-7). Das Projekt entstand in interdisziplinärer Zusammenarbeit mit Forschenden aus den Fachbereichen der Physik, der Biologie und der Medizin. Es wurde durch die Forschungsgruppe *Advanced Technologies in Radiation Therapy* (Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie, Klinikum rechts der Isar, München) und am Lehrstuhl für biomedizinische Physik (Fakultät für Physik TUM, Garching) betreut. Besonders eng fand die Zusammenarbeit mit Dr. Karin Burger (Physik) und Annique Dombrowsky (Biologie), unter der Supervision von Prof. Dr. Thomas Schmid, Prof. Dr. Jan Wilkens und Prof. Dr. Franz Pfeiffer, statt, welche auch für das Studiendesign verantwortlich waren.

3.1.1 Tumormodell

Für die Versuchsreihe wurden undifferenzierte humane Plattenepithel-Karzinom-Zellen des Hypopharynx (FaDu) heterotop in die Ohren von NMRI (nu/nu) Mäusen injiziert. Das Modell

entspricht dem 2015 von Oppelt et al. beschriebenen Tumormodell, welches für radiobiologische Experimente mit Laser-basierten Partikelstrahlen eingesetzt wurde. Diese Art der Bestrahlung weist, ähnlich wie die an der MuCLS erzeugte Röntgen-Mikrokanalstrahlung, eine sehr geringe Eindringtiefe auf, weshalb die zu bestrahlenden Tumoren sehr oberflächlich gelegen sein müssen. Das beschriebene Konzept stellt eine Adaption eines Tumormodells im Mausohr dar, welches 1965 durch Suit et al. dokumentiert wurde (Brüchner et al., 2014). Anhand histologischer Evaluationen der inokulierten Tumoren konnten die Forscher*innen Kriterien für den Bestrahlungszeitpunkt festlegen, an denen sich auch die vorliegende Studie orientierte. Zu ihnen zählten eine Mindestgröße von 2 mm sowie eine Rotfärbung der Tumoren, als Zeichen der einsetzenden Angiogenese (Oppelt et al., 2015). Das Modell konnte weiter optimiert werden, indem die Tumorzellinjektion mit einer Suspension von Tumorzellen in Matrigel, anstelle von Phosphat-gepufferter Salzlösung (*Phosphate Buffered Saline*, PBS), durchgeführt wurde. Dies führte zu einer höheren und stabileren Erfolgsrate des Tumorwachstums (Beyreuther et al., 2017).

Zelllinie FaDu

Die hier verwendete Zelllinie FaDu wurde erstmals 1972 durch Rangan beschrieben. Sie entstammt einem Plattenepithel-Karzinom des Laryngopharynx Grad II eines 56 Jahre alten Mannes, welches 1968 am *Chittarangan Cancer Hospital* in Kalkutta (Indien) diagnostiziert wurde. Der Name FaDu leitet sich vom Namen des Indexpatienten ab. FaDu-Zellen sind polygonale Epithelzellen, die in Kultur als Einzelschicht wachsen, aneuploid sind und eine Population-Verdopplungszeit von etwa 50 Stunden aufweisen (Rangan, 1972).

Im Rahmen der Versuche dieser Arbeit wurden die FaDu-Zellen bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einem Sauerstoffgehalt von 18,8 % im Inkubator (*Thermo Scientific™ BBD 6220 CO₂-Inkubator*, *Thermo Fisher Scientific*, *Fisher Scientific GmbH*, Schwerte, Deutschland) verwahrt. Das Zellmedium bestand aus *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) *low glucose* mit 1.000 mg Glukose/ml (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, München, Deutschland). Diesem wurden 10 % fetales Kälberserum (*Fetal Bovine Serum*, FCS; Lot: BCBR0718V) und jeweils 1 % *Sodium Pyruvat* 100 mM, Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep) und L-Glutamin 200 mM (alle *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*,

München, Deutschland) sowie HEPES (1 M)-Pufferlösung (*Gibco*TM, *Thermo Fisher Scientific*, Schwerte, Deutschland) hinzugefügt⁸.

NMRI (nu/nu) Mäuse

Der für die Versuche der vorliegenden Arbeit verwendete Mausstamm NMRI (nu/nu) gehört zu den thymusaplastischen Nacktmäusen. Die erste Maus dieser Art wurde von Flanagan 1966 am *Virus Laboratory* des *Ruchill Hospital* (Glasgow, Vereinigtes Königreich) beschrieben. Die Abkürzung nu/nu steht für das homozygot veränderte rezessive Gen „*Nude*“, was auf englisch nackt bedeutet und ihren augenfälligen Phänotypen beschreibt (Flanagan, 1966). Die Mutation konnte später als spontane *loss-of-function*-Mutation des Gens FoxN1 identifiziert werden. Das, für die onkologische Forschung, wichtigste Merkmal der Nacktmäuse ist eine Aplasie des Thymus, welche mit einem defizienten Immunsystem einhergeht. Diese natürliche Immunsuppression der Tiere qualifiziert sie als Tumormodell für die onkologische Forschung mit humanen Malignomzellen, da sie das erfolgreiche Engraftment der Tumoren ermöglicht (Pantelorius, 1973 und Charles River Laboratories, o. D.).

Für die vorliegende Arbeit wurden 35 NMRI (nu/nu) Mäuse von *Charles River Laboratories* (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Alle Tiere waren weiblich und zu Versuchsbeginn zwischen acht und zehn Wochen alt. Die Tierhaltung erfolgte am Klinikum rechts der Isar und entsprach den Richtlinien der Klinik sowie dem deutschen Tierschutzgesetz und der EU-Richtlinie 2010/63. Die Mäuse wurden bei 20 – 24 °C Raumtemperatur und 45 – 60 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Beleuchtung folgte einem zwölf Stunden Rhythmus. Das Futter entsprach standardisiertem Labortierfutter und Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung. Das Versuchsvorhaben wurde durch die zuständige Stelle der Regierung von Oberbayern genehmigt (Referenznummer 55.2.1.54-2532-62-2016, NTP-ID 00009166-1-7). Um zusätzlich zu der bereits vorhandenen Immunschwäche der Tiere eine weitere Immunsuppression zu erreichen und den Erfolg des Tumor-Engraftments zu steigern, wurden diese vor Versuchsbeginn ganzkörperbestrahlt. Die Behandlung fand zwei bis vier Tage vor der Injektion der Tumorzellen mit 4 Gy (200 kVp, 15 mA, Aluminium Filter, 4 min 12 s) an der Bestrahlungsanlage *Gulmay RS225* (ehemals *Gulmay Medical*, jetzt *Xstrahl Limited*, Camberley, Vereinigtes Königreich) statt. Es wurden jeweils zehn Mäuse in einem Käfig, der nur Bewegungen in zwei Dimensionen

⁸ Alle genutzten Materialien werden in Klammern hinter dem entsprechenden Produkt im Text spezifiziert. Im Anhang findet sich zusätzlich eine tabellarische Aufstellung aller verwendeten Materialien und Geräte (Tabellen A.3 - A.7).

zuließ, gemeinsam behandelt. Im Anschluss erfolgte eine Antibiotikaprophylaxe mit einer einmaligen subkutanen Gabe von 1 µl/g Körpergewicht (KG) Convenia (Zoetis Schweiz GmbH, Zürich, Schweiz) in einem Verhältnis von 27 : 73 in 0,9 % Kochsalzlösung (NaCl) (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), welche die Versuchstiere vor etwaigen Infektionen schützen sollte. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch das Ausgangsgewicht jeder Maus bestimmt. Zur Unterscheidung der Versuchstiere bekamen diese Lochmarkierungen in das linke Ohr, welche die jeweilige Maus als eine der Nummern eins bis fünf pro Käfig identifizierten. Diese wurden entweder am Tag der Ganzkörperbestrahlung oder, wenn möglich, zum späteren Zeitpunkt der Tumorzellinjektion durchgeführt, um das Trauma für die Tiere zu minimieren. Zur Überbrückung dienten dann Strichmarkierungen am Schwanz zur Identifizierung der Mäuse, die mit einem Permanentmarker täglich aufgefrischt wurden. Auch beim Transport an die MSB wurden, wenn zwei Mäuse aus unterschiedlichen Käfigen mit den gleichen Nummern bestrahlt werden sollten, entsprechende Markierungen mit dem Permanentmarker am Schwanz vorgenommen.

Zwei bis vier Tage nach der Ganzkörperbestrahlung wurden die Tumorzellen in das rechte Ohr der Versuchstiere injiziert. Die Injektionen fanden an drei unterschiedlichen Tagen statt, um zu gewährleisten, dass nicht alle Tumoren zeitgleich die Kriterien für eine Bestrahlung an der MuCLS erfüllen würden. Die FaDU-Zellen wurden in Form einer Suspension aus 10^5 Zellen in 50 µl Matrigel (#356237, Lot: 6137013; *Corning Matrigel Basement Membrane Matrix, Corning Inc., Tewksbury, MA, USA*) appliziert. Für eine präzise Injektion wurde der Eingriff in Anästhesie durchgeführt. Die Narkose bestand aus einer intraperitonealen Gabe einer Kombination aus Medetomidin (0,50 mg /kg KG), Midazolam (5,0 mg /kg KG) und Fentanyl (0,05 mg /kg KG) (MMF; aus eigener Herstellung am Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland), angepasst an das Körpergewicht der jeweiligen Maus. Zum Schutz vor Austrocknung wurde Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) auf die Augen der Mäuse aufgetragen. Um ein Auskühlen zu verhindern, wurde der Eingriff in dem Licht einer Infrarot-Lampe durchgeführt. Vor der Injektion wurde die Tumorzelllösung mithilfe eines Vortexmischers (*Digital Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA*) erneut durchmischt. Im Mittel wurden 3 – 5 µl Tumorzelllösung pro Maus, mittig in das rechte Ohr zwischen Knorpel und Haut eingebracht. Hierzu wurde das Ohr mit einer flachen Pinzette (CK T2364 Edelstahl Pinzette, *RS Components GmbH, Gmünd, Österreich*) längs gefaltet, sodass die Lösung in einem flachen Einstichwinkel parallel zu den Gefäßen in das Gewebe eingespritzt werden konnte. Da die Ohren der Mäuse nur 200 – 300 µm dick sind, ist dies schwierig und zum Teil waren mehrere Injektionsversuche

nötig. Um interpersonelle Unterschiede zwischen den Injektionen ausschließen zu können, wurden diese ausnahmslos durch Marlon Stein (*Technical Assistant*, Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) durchgeführt. Nach erfolgreicher Injektion wurde die Narkose mit der subkutanen Gabe einer Kombination aus Atipamezole (2,5 mg/kg KG), Flumazenil (0,5 mg/kg KG) und Naloxon (1,2 mg/kg KG) (AFN; aus eigener Herstellung am Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland), angepasst an das Körpergewicht des jeweiligen Versuchstieres, antagonisiert.

Das Tumorwachstum wurde regelmäßig kontrolliert und sichtbare Tumoren ab einer Mindestlänge von 0,5 mm alle zwei Tage vermessen. Die Messungen wurden manuell mithilfe eines digitalen Messschiebers, mit einer Genauigkeit von 0,01 mm (*DigiMax 29422*, Wiha, Buchs, Schweiz) durchgeführt. Das Tumormodell im Ohr machte es hierbei möglich die Größe der Tumoren dreidimensional zu bestimmen: gemessen wurden die Länge, parallel zu den Gefäßen des Ohres, die Breite, senkrecht in derselben Ebene hierzu, sowie die Höhe des Tumors, in der Richtung der Dicke des Ohres. Für den Zeitpunkt der Bestrahlung war die Tumorfläche, welche als Produkt aus der Länge und der Breite definiert war, ausschlaggebend. Ihre Größe wurde durch die technischen Voraussetzungen an der MuCLS vorgegeben: hier stand ein rundes Bestrahlungsfeld mit einem Durchmesser von 2,3 mm zur Verfügung, welches zusätzlich, für längliche Tumoren nebeneinandergelegt, zu einer elliptischen Fläche von $1,5 \cdot 2,8 \cdot \pi \text{ mm}^2$ angepasst werden konnte. Für die Studie war es somit einerseits relevant Tumoren mit einer ähnlichen Größe, von etwa $2 \text{ mm} \cdot 1,5 \text{ mm}$ zu bestrahlen. Andererseits zählte die adäquate Durchblutung des entsprechenden Tumors als zweites Kriterium für den Einschluss in die Studie. Diese führte zu einer sichtbaren Rotfärbung und zeigte den Beginn des exponentiellen Wachstums an. Zusätzlich zur Fläche der Tumoren wurde auch ihr Volumen bestimmt, welches die entscheidende Größe darstellte, nach der das Wachstum der Tumore, nach der Bestrahlung, beurteilt wurde.

3.1.2 Tumorwachstumsverzögerung

Mittels der Analyse des Tumorwachstums sollte das Ausmaß des strahleninduzierten Schadens und damit die biologische Effektivität der eingesetzten radiotherapeutischen Modalitäten evaluiert werden. Durch regelmäßiges Vermessen der Tumordimensionen, ließ sich das Wachstum dokumentieren und graphisch, in Abhängigkeit von der Zeit, als Wachstumskurven darstellen. Anhand dieser Daten wurden die Zeiträume bestimmt, die unbehandelte sowie behandelte Tumoren benötigen, um eine zuvor festgelegte Größe zu erreichen. Die Differenz beider Zeitspannen stellte die therapie-induzierte Verzögerung des Tumorwachstums dar.

A. Röntgen-Mikrokanalbestrahlung

Sowohl die Bestrahlung mit Röntgen-Mikrokanälen als auch die konventionelle Bestrahlung fanden an der MuCLS statt. Die dortige Erzeugung ionisierender Strahlen basiert, wie zuvor im Rahmen der Einleitung (Kapitel 1.2.4) beschrieben, auf dem Konzept der inversen Compton-Streuung. Die hierzu benötigten relativistischen Elektronen werden an der MuCLS mittels einer Radiofrequenz-Photokathodenquelle erzeugt und in einem Linearbeschleuniger auf Energien von 25 – 45 MeV gebracht. Anschließend werden sie in einen Elektronenspeicherring mit einem Umfang von etwa 4,6 m gespeist, wo sie mit verstärkten Pulsen eines Nd:YAG-Lasers ($\lambda = 1.046 \text{ nm}$) kollidieren. An diesem Interaktionspunkt, der nur etwa $50 \mu\text{m} \cdot 50 \mu\text{m}$ misst, entstehen so Röntgenstrahlen mit einer Folgefrequenz von etwa 65 MHz. Das Röntgenstrahlenbündel wird auf einen Winkel von 4 mrad begrenzt und gelangt durch eine Vakuurröhre an das Ziel, welches, je nach Versuchsaufbau, zwischen 3 m und 15 m entfernt vom Interaktionspunkt, welcher der eigentlichen Röntgenquelle entspricht, liegt. Die Energie der Röntgenstrahlen ist durch Veränderung des Energieniveaus der Elektronen in einem Bereich zwischen 15 keV und 35 keV frei regulierbar. Die Bandbreite beträgt bei 25 keV etwa 4 %. Die an der MuCLS erzeugten Röntgenstrahlen können demnach als quasi-monochromatisch betrachtet werden. Der Photonenfluss des Mini-Synchrotrons lag während dieser Versuchsreihe zwischen $4,43 \cdot 10^9 \text{ ph/s}$ bei 15,3 keV und $1,78 \cdot 10^{10} \text{ ph/s}$ bei 35,0 keV und konnte über mehrere Stunden stabil gehalten werden. Das entspricht einer Brillanz von $0,6 \cdot 10^{10} \text{ ph/s/mm}^2/\text{mrad}^2/0,1 \text{ \% Bandbreite}$. Damit liegt die Leistung der MuCLS zwischen denjenigen von herkömmlichen Laborquellen und großen Synchrotronanlagen. Die kompakte Strahlenquelle ist mit ihrer Grundfläche von nur $3 \text{ m} \cdot 5 \text{ m}$ jedoch viel kleiner als ein LINAC oder konventionelle Teilchenbeschleuniger (Eggl et al., 2016 und Burger, 2017).

Für die *in vivo* Bestrahlungen dieser Arbeit wurden an der MuCLS, um eine bestmögliche Dosisrate und einen möglichst stabilen Photonenflusses zu erreichen, 25 keV Röntgenstrahlen eingesetzt. Bei dieser Energie wurde ein Photonfluss von $1 \cdot 10^{10} \text{ ph/s}$ erreicht, die Bandbreite der Strahlen lag bei 3,6 %. Der Versuchsaufbau für die *in vivo* Bestrahlungen befand sich in einem Abstand von ca. 3,7 m zum Interaktionspunkt. Zur Erzeugung der für die MRT charakteristischen Dosisverteilung wurde ein Absorptionsgitter bestehend aus Silikon und Gold als Kollimator eingesetzt (Burger, 2017).

Den Versuchen der vorliegenden Arbeit ging eine Pilotstudie mit demselben Tumormodell voraus, um die Rahmenbedingungen, inklusive der verwendeten Bestrahlungsdosen, des genauen Versuchsaufbaus und des Beobachtungszeitraums zu determinieren. Obwohl diese nicht Teil meiner Dissertation war, möchte ich sie, um ein logisches Gesamtbild zu vermitteln,

einleitend einfließen lassen. Detaillierte Beschreibungen der Pilotstudie finden sich in Burger, 2017 und Dombrowsky et al., 2020. Der erste Teil der Vorstudie fand an der *Small Animal Radiation Research Platform* (SARRP, *Xstrahl Limited*, Camberley, Vereinigtes Königreich) statt. Hier wurden jeweils zwei tumortragende Mäuse mit einer Dosis von 3 Gy oder 6 Gy konventionell homogen bestrahlt. Zusätzlich dienten drei weitere tumortragende Tiere als unbehandelte Kontrollen. Der Zeitpunkt der Bestrahlung war abhängig vom Wachstumsverhalten der Tumoren. Diese mussten etwa 1,8 mm • 2 mm groß sein und eine sichtbare Durchblutung zeigen, um die Kriterien für die Bestrahlung zu erfüllen. Die Tumorgöße richtete sich hierbei, um gleiche Voraussetzungen zu schaffen, nach dem oben beschriebenen Aufbau an der MuCLS. Nach der Bestrahlung wurde die zunehmende Tumorgöße über 30 Tage dokumentiert und das Tumorwachstum zwischen den drei Versuchsgruppen anhand von Wachstumskurven verglichen. Alle Kontroll-Tumoren erreichten das Fünfzehnfache ihres Ausgangsvolumens nach maximal zwölf Tagen. Das entsprach einer durchschnittlichen Tumorverdoppelungszeit von $2,76 \pm 0,4$ Tagen. Die Bestrahlung mit 3 Gy führte bei einem der zwei entsprechend behandelten Tumoren zu einer Wachstumsverzögerung, während beide Tumoren, die mit 6 Gy bestrahlt worden waren, durch die Behandlung kontrolliert wurden. Aus diesen Ergebnissen wurden die Strahlendosen für die Versuche an der MuCLS abgeleitet und auf 3 Gy und 5 Gy festgelegt, da sie innerhalb des schmalen Dosisbereiches liegen sollten, der zu einer Wachstumsverzögerung, nicht aber zu einer Ablation der Tumoren führte.

Der zweite Teil der Vorstudie fand dann im Anschluss, als *proof-of-principle*-Studie, mit sieben Versuchstieren an der MuCLS statt, wo eine räumlich fraktionierte Bestrahlung mit einer mittleren Dosis von 3 Gy beziehungsweise 5 Gy sowohl mit einer konventionell homogenen Bestrahlung mit 3 Gy beziehungsweise 5 Gy als auch mit einer „Schein-Bestrahlung“ als Kontrolle verglichen werden sollte. Jeder Bestrahlungsmodalität und -dosis wurde zufällig eine Maus zugeteilt. Zwei zusätzliche Mäuse waren Teil einer histologischen Analyse des Effektes der Röntgen-Mikrostrahlen, mittels γ -H2AX-Färbung als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche. Die Bestrahlungskriterien glichen den weiter oben geschilderten Kennzeichen der Tumoren, die auch für die vorliegende Studie verwendet wurden. Auch der Versuchsaufbau entsprach demjenigen, der für das hier vorgestellte Dissertationsprojekt wiederverwendet wurde. Er wird im Folgenden detailliert beschrieben. Alle Bestrahlungen des Vorversuchs an der MuCLS schienen das Tumorwachstum im Vergleich zu der „schein-behandelten“ Kontrolle zu verlangsamen. Der Tumor der unbehandelten Maus erreichte in diesem zweiten Teil der Pilotstudie das Fünfzehnfache seines Ausgangsvolumens nach

21 Tagen. Dieser Zeitraum verlängerte sich mit einer Steigerung der applizierten Dosis, unabhängig von der Bestrahlungsmethode. Eine MRT mit 3 Gy verzögerte das Wachstum um 3,5 Tage, eine homogene Bestrahlung mit derselben Dosis um neun Tage. Nach einer räumlich fraktionierten Dosis von 5 Gy verlängerte sich der Wachstumszeitraum um 13,5 Tage und nach einer homogenen Dosisapplikation von 5 Gy sogar um 16,5 Tage. Die histologische Studie konnte Tumorzellknoten eingebettet in Matrigel gut abgegrenzt vom umliegenden Gewebe nachweisen. Mittels der γ -H2AX-Färbung konnten DNA-Doppelstrangbrüche in 50 μ m breiten Streifen, welche den Mikrokanälen entsprachen, visualisiert werden. Für beide Teile der Vorstudien lag die Erfolgsrate der Tumorzellinjektion zwischen 77 % und 78 %. Im Rahmen der Pilotstudie konnte demnach einerseits das beschriebene Tumormodell erfolgreich übernommen werden. Andererseits wurde gezeigt, dass eine Bestrahlung mit Röntgen-Mikrokanälen an der MuCLS durchführbar ist und einen ähnlichen strahlenbiologischen Effekt zu zeigen scheint, wie jene an den großen Synchrotronanlagen (Burger, 2017 und Dombrowsky et al., 2020).

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen entstand die vorliegende Forschungsarbeit, welche, unter anderem, diesen initial entstandenen Eindruck durch größere Versuchsgruppen zu bestätigen versuchen sollte. Die Bestrahlungen an der MuCLS fanden zwischen dem 26.01.2017 und dem 26.02.2017 statt. Die Versuchstiere mussten, für die Strahlenbehandlung, von der Tierhaltung am Klinikum rechts der Isar an die MSB transportiert werden. Für den Transport standen Transportkäfige zur Verfügung. Den Zeitpunkt der Bestrahlung legten, wie zuvor beschrieben, zwei Attribute der Tumoren fest: sie mussten eine Größe von etwa 2 mm • 1,5 mm und eine Rotfärbung aufweisen. Das Vorgehen beim Vermessen der Tumoren wird im nachfolgenden Abschnitt über die Dokumentation des Tumorwachstums beschrieben. Die Bestrahlung fand in Anästhesie statt. Diese entsprach dem oben beschriebenen intraperitonealen Narkoseverfahren mit MMF und wurde in einem Reinraum an der MSB verabreicht. Für die Lagerung der Versuchstiere während der Behandlung wurde eine, eigens im Rahmen der Vorstudie entwickelte, Haltevorrichtung mit kontrollierbarer Temperatur verwendet. Sie wurde vor jedem Positionieren einer Maus auf 32 – 33 °C vorgeheizt. Die Versuchstiere wurden in eine Rechtsseitenlage gebracht, sodass das tumortragende Ohr nach unten durch einen Schlitz zu einer Halterung geführt werden konnte, wo es mittels Heftpflasterstreifen fixiert wurde. Hierbei kam der Tumor zentral in einer runden Aussparung der Halterung zum Liegen. Hinter dem Ohr wurde ein radiochromer Film angebracht, um die erfolgte Bestrahlung dokumentieren und auswerten zu können. Nach der sorgfältigen Lagerung wurde die Haltevorrichtung samt der zu bestrahlenden Maus zurück in den Versuchsaufbau integriert, wo sie durch einen beheizbaren

Aluminiumblock konstant auf der Temperatur von 32 – 33 °C gehalten wurde, die nur in wenigen Ausnahmen zwischen 31 °C und 34 °C schwankte. Mittels eines Sensors wurde die Temperatur laufend überwacht. Weitere Teile der Versuchsanordnung waren eine Blende zur Präzision der Röntgenstrahlen, an der auch der demontierbare Kollimator zur Erzeugung der Mikrostrahlen befestigt werden konnte sowie ein Szintillationszähler, mithilfe dessen die Intensität der ionisierenden Strahlung überwacht werden konnte. Eine genaue Beschreibung der Bestrahlungseinheit an der MuCLS findet sich bei Burger, 2017.

Mit Hilfe eines durch das fixierte Ohr fallenden Lichtstrahls und einer dahinter platzierten Kamera, wurde der Tumor manuell zentral im Bestrahlungsfeld ausgerichtet und fotografisch dokumentiert. Je nach Tumorgröße war es entweder möglich ihn mit einem runden Bestrahlungsfeld mit einem Durchmesser von 2,3 mm einmalig zu bestrahlen oder, für größere Tumoren, das Bestrahlungsfeld durch eine sequentielle Bestrahlung elliptisch auf eine Größe von $1,5 \cdot 2,8 \cdot \pi \text{ mm}^2$ auszuweiten. Nach dieser intensiven Vorbereitung konnte die Bestrahlung gestartet werden. Sie wurde hauptsächlich durch Dr. Martin Dierolf und Benedikt Günther (beide Fakultät für Physik, TUM) durchgeführt.

Der Bestrahlungsmodus und die Dosis wurden jedem Versuchstier vorab zufällig zugewiesen. Es existierten fünf mögliche Behandlungen: zum einen die „Schein-Bestrahlung“, bei der die Mäuse, wie beschrieben vorbereitet, jedoch keine Röntgenstrahlen erzeugt wurden. Zum anderen entweder die konventionell homogene oder die räumlich fraktionierte Bestrahlung, jeweils mit den, durch die Pilotstudie festgelegten, Dosen von 3 Gy oder 5 Gy. Für jede Versuchsgruppe waren fünf Mäuse vorgesehen. Um die statistische Relevanz zu gewährleisten, sollte mit jeder Therapiemodalität und -dosis noch eine zusätzliche Maus behandelt werden. Da nicht alle Mäuse einen Tumor entwickelten und die Zuteilung zu den Gruppen zufällig geschah, unterschieden sich die Gruppengrößen leicht voneinander. Die Kontrollgruppe zählte letztendlich fünf ‘schein-bestrahlte’ Mäuse und eine unbestrahlte Maus, die nicht nach Garching an die MSB transportiert wurde. Jeweils sechs Mäuse erhielten eine homogene Dosis von 3 Gy beziehungsweise 5 Gy. Und jeweils sieben Versuchstiere erhielten eine Röntgen-Mikrokanalbestrahlung. Diese bestand aus jeweils zehn 50 µm breiten Mikrostrahlen mit einem Mittenabstand von 350 µm zueinander, welche ebenfalls eine mittlere Dosis von 3 Gy beziehungsweise 5 Gy an das Zielvolumen abgaben. Hierbei betragen die Peak-Dosen 21 Gy, bei der integrierten Dosis von 3 Gy, und 35 Gy, bei der integrierten Dosis von 5 Gy. In beiden Fällen lag die Valley-Dosis unter 200 mGy. Das PVDR, welches in einer separaten Arbeit bestimmt wurde (Urban, 2017) lag dementsprechend über 200.

Während der gesamten Behandlung waren die Mäuse videoüberwacht. Die Abbildung 3.1 zeigt die Positionierung der Versuchstiere in der Haltevorrichtung während den Bestrahlungen. Nach Beendigung der Bestrahlung wurde das jeweilige Versuchstier aus der Halterung genommen und zurück in den Transportkäfig gelegt. Die Narkose wurde, wie zuvor in der Versuchsvorbereitung, durch eine subkutane Gabe von AFN antagonisiert. Nach einer Erholungsphase konnten die Mäuse zurück ans Klinikum rechts der Isar gebracht werden, wo sie für die restliche Beobachtungszeit unter Quarantänebedingungen, bei einer Luftfeuchtigkeit von 19 % und einer Raumtemperatur von 20 °C, gehalten, sowie die Tumore regelmäßig vermessen wurden.

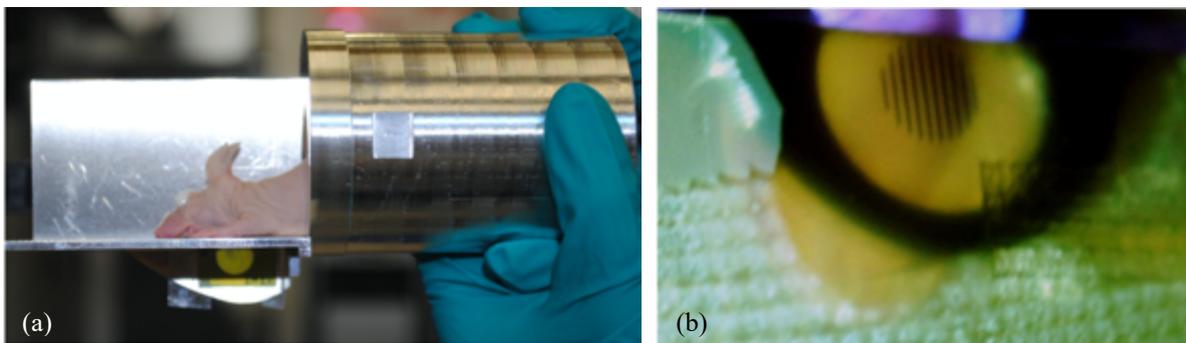


Abbildung 3.1 Positionierung der Mäuse und Tumoren im Versuchsaufbau an der MuCLS

Die Mäuse wurden in Rechtsseitenlage in die Haltevorrichtung gelegt (a), sodass das tumortragende rechte Ohr durch einen Schlitz nach unten vor die Öffnung geführt werden konnte. An dieser wurde zu Auswertungs- und Dokumentationszwecken zusätzlich ein radiochromer Film angebracht (b).

B. Tumormessung und Volumenberechnung

Durch die Erkenntnisse der oben geschilderten Pilotstudie, konnte der Endpunkt für den hier vorgenommenen Vergleich des Tumorwachstums auf das Fünfzehnfache des Ausgangsvolumens, zum Zeitpunkt der Bestrahlung, festgelegt werden. Weiters wurden Abbruchkriterien für die Beobachtung definiert. Maß ein Tumor im Durchmesser mehr als 8 mm, oder litt eine Maus sichtbar unter der malignen Erkrankung, schied das bestroffene Versuchstier vorzeitig aus dem Versuch aus. Zur Berechnung des Tumolvolumens wurden die Dimensionen der Tumoren alle zwei Tage gemessen. Die Messung erfolgte stets zu zweit. Mit einer Pinzette (CK T2364 Edelstahl Pinzette, RS Components GmbH, Gmünd, Österreich) wurde das tumortragende Ohr der Maus gespannt und der Tumor manuell mit einem digitalen Messschieber (*DigiMax* 29422, Wiha, Buchs, Schweiz), der eine Genauigkeit von 0,01 mm aufwies, vermessen. Hierzu wurde zunächst die größte Ausdehnung, als Länge (L) bestimmt, dann die zu ihr senkrecht ausgerichtete Breite (B) und zuletzt die Tumorthöhe (H), deren Richtung der Dicke des Ohres entsprach. Um den statistischen Fehler durch interpersonelle

Messunterschiede so gering wie möglich zu halten, wurden die Messungen fast ausschließlich von mir durchgeführt, wobei mich Annique Dombrowsky, Marlon Stein und Karin Burger durch das Halten der Tiere und das Protokollieren unterstützten. In der Abbildung 3.2 ist die Vermessung der Tumoren beispielhaft dargestellt.

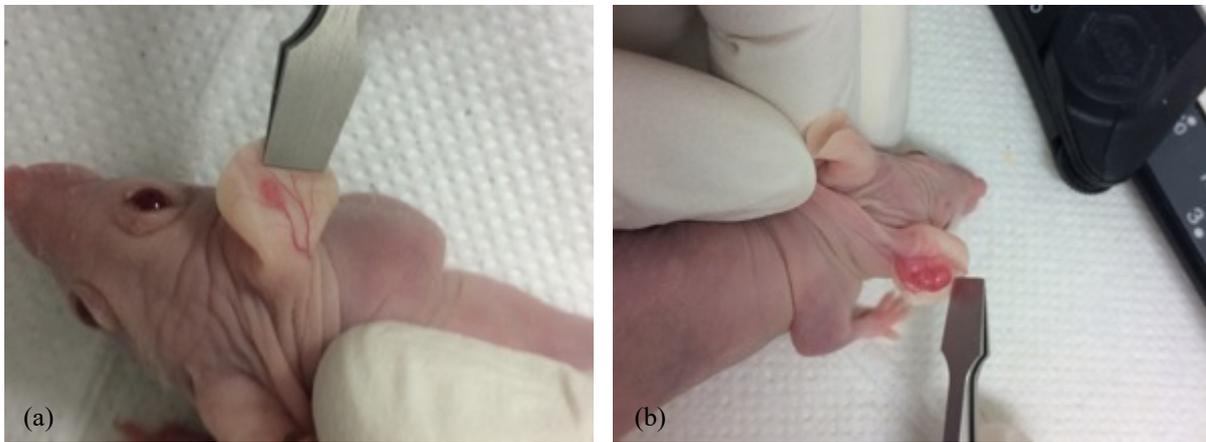


Abbildung 3.2 Heranwachsende Tumoren in den Mäuseohren

Ab einer Größe von etwa $1,5 \cdot 2,0 \text{ mm}^2$ und dem Zeitpunkt einer adäquaten Durchblutung konnten die FaDu-Tumoren bestrahlt werden (a). Das Tumorstadium wurde alle zwei Tage kontrolliert und dokumentiert (b). Eine Verhundertfachung des Ausgangsvolumens zum Zeitpunkt der Bestrahlung galt als Endpunkt für die Analyse der Tumorstadiumsverzögerung.

Für eine möglichst genaue Aussage über die relative und absolute Tumormasse, wurde das elliptische Volumen der Tumoren nach folgender Formel bestimmt (Tomayko & Reynolds, 1989):

$$V = \frac{\pi}{6} * L * B * H \quad (3.1).$$

Das relative Volumen wurde als Verhältnis des finalen Volumens am Tag D_x zum Ursprungsvolumen am Tag der Bestrahlung D_0 angegeben:

$$V_{rel,x} = \frac{V_{Dx}}{V_{D0}} \quad (3.2).$$

Wie oben bereits geschildert, waren für jede Behandlung, also die „Schein-Bestrahlung“, die konventionell homogene Bestrahlung mit 3 Gy und 5 Gy sowie die Röntgen-Mikrokanalbestrahlung mit mittleren Dosen von 3 Gy und 5 Gy, jeweils fünf Mäuse vorgesehen. Jedoch zeigten nur zwei der „schein-bestrahlten“ Kontrolltiere ein ausreichendes Tumorstadium. Deshalb wurden im April 2017 neun weitere acht bis zehn Wochen alte weibliche NMRI (nu/nu) Mäuse (*Charles River Laboratories*, Sulzfeld, Deutschland) als zweite, allerdings unbehandelte, Kontrollgruppe eingesetzt. Die Vorbereitung mittels Ganzkörperbestrahlung und Tumorzellinjektion, die Haltung und Beobachtung sowie die Vermessung der Tumoren entsprachen den oben geschilderten Abläufen und Techniken. Somit

dienten für die Bestimmung der therapie-induzierten Wachstumsverzögerung sowohl „schein-bestrahlte“ Mäuse als auch unbehandelte Mäuse als Kontrollen.

Erreichte ein Tumor eine adäquate Größe, wurde die entsprechende Maus mittels zervikaler Dislokation getötet, der Tumor reseziert und die Tumorzellen zurück in die Zellkultur überführt. Die diesbezüglich angewandte Methode wird weiter unten im Rahmen des in vitro Teils der Studie noch ausführlich beschrieben. Der durchschnittliche Zeitraum von der Injektion der Tumorzellen in die Mäuseohren bis zu ihrer Isolation und Rückführung in Kultur betrug 51,5 Tage ($SD = 9,4$).

C. Statistische Analyse: Wachstumsverzögerung und Wachstumskurven

Alle Daten bezüglich des Tumorwachstums wurden in Kalkulationstabellen in *Numbers* (Version 6.1, *Apple Inc.* Cupertino, USA) gesammelt und zusammengefasst. Diese beinhalteten neben den Daten der einzelnen Tumormessungen, sowohl die Zeitpunkte der Vorbereitung der Mäuse mittels Ganzkörperbestrahlung, Markierung und Tumorzellinjektion als auch den Tag die Dauer und die Art der Bestrahlung. So konnten die mittleren Zeitspannen bis zur Ausbildung eines sichtbaren Tumors, bis zum Erreichen der Bestrahlungskriterien, sowie bis zur Isolation der Tumorzellen insgesamt und auch die durchschnittliche Behandlungsdauer der unterschiedlichen Gruppen mit ihren Standardabweichungen berechnet werden.

Die Datenreihen der Tumordimensionen wurden anhand der vorausgehenden Behandlung des Tumors in die fünf experimentellen Kategorien gruppiert. Für jeden Tumor wurden anschließend mittels der Formeln 3.1 und 3.2 die absoluten und relativen Volumina (V und V_{rel}) für jeden einzelnen Messzeitpunkt berechnet. Da die Messungen nicht täglich stattfanden, sondern durchschnittlich in Abständen von zwei bis drei Tagen, wichen die Messzeitpunkte für die Tumoren voneinander ab und konnten nicht direkt miteinander verglichen werden. Um dennoch ein gruppenspezifisches durchschnittliches Wachstum beschreiben zu können, wurden die Daten auf unterschiedliche Weise aufbereitet. Für die Tumoren der Kontrollgruppe wurde von einem exponentiellen Wachstum ausgegangen. Deshalb wurde für jeden Tumor eine nicht lineare Regression der Messdaten nach der Formel

$$f(x) = \alpha * e^{\beta * x} \quad (3.3)$$

durchgeführt, um das Wachstum mathematisch darstellen zu können. Hierbei beschreibt x den Messzeitpunkt und $f(x)$ das relative Volumen zu diesem Zeitpunkt x . Die Regression fand mit dem Statistikprogramm R (R Version 4.0.2, *The R Foundation*, Wien, Österreich, <https://www.r-project.org/about.html>) statt. Aus den tumorspezifischen Koeffizienten α und β

konnte dann ein gruppenspezifischer Mittelwert für beide berechnet werden. Mithilfe dieser wurde anschließend eine durchschnittliche Gleichung für das mittlere Wachstumsverhalten der gesamten Gruppe gebildet, bei der für beide Koeffizienten α und β der Standardfehler mit angegeben wurde. Aus der so entstandenen Formel, für das durchschnittliche exponentielle Wachstum der Kontrolltumoren, wurde die Referenzwachstumskurve angefertigt, gegen die das Wachstum der bestrahlten Tumoren graphisch verglichen werden konnte. Zusätzlich wurde aus den tumorspezifischen Wachstumskoeffizienten der Zeitpunkt des Erreichens des Fünfzehnfachen Volumens für jeden Tumor bestimmt. Der aus diesen Zeitpunkten gebildete Mittelwert für die Kontrollgruppe (T_{V15K}) diente dann als Vergleichswert für die Berechnung der Wachstumsverzögerung durch die Bestrahlung.

Unter der Annahme, dass das Wachstumsverhalten nach einer Behandlung mit ionisierenden Strahlen von einem exponentiellen Verlauf abweicht, konnte für die Daten der bestrahlten Gruppen, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, keine Regressionsanalyse durchgeführt werden. Für sie wurde für jedes volle Vielfache des relativen Tumorumens der entsprechende Zeitpunkt durch lineare Interpolation bestimmt. Nun konnte für jede bestrahlte Versuchsgruppe (X) der Zeitpunkt berechnet werden, zu dem die Tumoren durchschnittlich auf das Fünfzehnfache ihres Ausgangsvolumens herangewachsen waren (T_{V15X}). Diese mittlere Dauer bis zum Erreichen des Endpunktes konnte anschließend für jede Versuchsgruppe mit der Kontrollgruppe verglichen werden. Die Differenz beider Werte stellte die Wachstumsverzögerung (T_d) in Tagen dar:

$$T_d = T_{V15X} - T_{V15K} \quad (3.4).$$

Die Unterschiede zwischen den gruppenspezifischen Werten für den Zeitpunkt des Erreichens des Endvolumens (T_{V15}) der bestrahlten Gruppen und der Kontrollgruppe wurden mittels individueller t-Tests für jede Gruppe in jamovi (*The jamovi project 2020. jamovi Version 1.2., <https://www.jamovi.org>*) auf statistische Signifikanz hin überprüft.

3.2 In vitro Studie

Um die biologischen Effekte der unterschiedlichen strahlentherapeutischen Behandlungen auf zellulärer Ebene zu untersuchen und zu vergleichen, wurden die zuvor in vivo bestrahlten Tumorzellen isoliert und in Einzelzellsuspension zurück in die Zellkultur überführt. Ziel war es die Strahlensensibilität der überlebenden Zellen im Rahmen eines Koloniebildungstests sowie den zytotoxischen Effekt der Bestrahlungen anhand zytogenetischer Veränderungen durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung zu evaluieren. Die Ergebnisse sollten die aus der Analyse

der Wachstumsverzögerung gewonnenen Informationen ergänzen. Dies geschah zum einem vor dem Hintergrund, dass die strahleninduzierte Verlangsamung des Tumorwachstums nicht nur auf einen direkten zytotoxischen Schaden der Tumorzellen, sondern auch auf den sogenannten Tumorbett-Effekt zurückzuführen ist, bei dem auch stromale und vaskuläre Veränderungen einen Einfluss auf die Proliferation der überlebenden Tumorzellen nehmen (Begg, 1980). Die relative biologische Effektivität in vivo kann sich folglich von derjenigen in vitro unterscheiden. Zum anderen sollten auch Eigenschaften der bestrahlten Tumorzellen untersucht werden, die einen potentiellen Einfluss auf Langzeitfolgen der strahlentherapeutischen Behandlung haben. Die zeltkulturellen Experimente sollten hier einerseits Aufschluss über die Strahlensensibilität der Tumorzellen geben, welche Auswirkungen auf den Therapieerfolg sowie das Rezidivrisiko hätte. Andererseits wurden potentielle mutagene Veränderungen untersucht, welche in Zusammenhang mit der zytotoxischen Wirkung der Bestrahlung sowie mit einer potentiellen Karzinogenität der strahlentherapeutischen Methoden stehen können. Beides ist für die Einschätzung des längerfristigen Therapieerfolges von Bedeutung.

3.2.1 Isolierung und Kultivierung der FaDu Tumorzellen

Sobald die Wachstumsstudie für das entsprechende Versuchstier abgeschlossen war, also der Tumor mindestens das Fünfzehnfache seines Ausgangsvolumens erreicht hatte, konnten die FaDu-Zellen isoliert werden. War dies der Fall, wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet und im Anschluss zur Desinfektion in Ethanol gebadet. Danach konnte sie auf die sterile Werkbank (*Thermo Scientific™ Herasafe™ KS* biologische Sicherheitswerkbank, *Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific GmbH*, Schwerte, Deutschland) transferiert werden, wo im ersten Schritt in einer Zellkulturschale (*TPP Techno Plastic Products AG*, Trasadingen, Schweiz) das tumortragende Ohr mit einem Skalpell (*Feather disposable scalpel No.22 steril, Feather Safety Razor Co.*, Osaka, Japan) vom restlichen Körper separiert und der Tumor freigelegt wurde. In einer zweiten Zellkulturschale wurde der Tumor von der Haut und dem umgebenden Bindegewebe gelöst und das Tumorgewebe in etwa 1 mm³ große Fragmente zerkleinert. In dieser Phase mussten die Gewebestücke stets mittels PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, München, Deutschland) benetzt gehalten werden. War das Gewebe adäquat aufbereitet, konnten ihm 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, München, Deutschland) zugefügt werden. Die Suspension wurde mithilfe einer Pipette gut gemischt und dann in ein *GentleMaCS C Tube* (*Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG*, Bergisch Gladbach, Deutschland) überführt. Mittels des

GentleMaCS Dissociator (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurden die Tumorfragmente in zwei 37 Sekunden langen, durch eine zweiminütige Pause getrennten, Programmdurchläufen weiter aufgespalten und so in Einzelzellsuspension gebracht. Dieser wurden dann unmittelbar 6 ml Medium, bestehend aus DMEM *low glucose* mit 10 % FCS sowie je 1 % HEPES, L-Glutamin und *Sodium Pyruvat*, hinzugefügt. Anschließend wurde sie in einem 50 ml Reagenzröhrchen (*Cellstar® Tubes*, Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) bei Raumtemperatur mit 300 g Beschleunigung für sieben Minuten zentrifugiert (*Heraeus Multifuge 3SR Plus Centrifuge*, Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland). Der Überstand wurde in eine T75-Zellkulturflasche (*Cellstar® cell culture flask*, Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) überführt und das Pellet mit weiteren 6 ml Medium resuspendiert. Um potentiell noch vorhandene andere größere Zellen von den Tumorzellen zu trennen, wurde die Suspension durch einen *Cell Strainer* mit 70 µm weiten Poren (*BD Falcon Cell Strainer*, BD Bioscience, Bedford, MA, USA) gefiltert und in ein neues Reagenzröhrchen überführt, in dem sie erneut und bei den gleichen Einstellungen wie zuvor zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde zum vorherigen, in die T75-Zellkulturflasche, hinzugefügt. Das Pellet konnte dann in insgesamt 5 ml Medium resuspendiert und in eine T25-Zellkulturflasche überführt werden. Die FaDu-Zellen wurden danach dauerhaft mit 1 µl/ml Gentamycin (50 mg/ml; *Gibco™*, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) und für die ersten zehn Tage zusätzlich mit 10 µl/ml Fungin (10 mg/mL; InvivoGen, Toulouse, Frankreich) kultiviert. Sie wurden bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO²-Gehalt von 5 % und einem Sauerstoffgehalt von 18,8 % unter sterilen Bedingungen inkubiert. Zweimal in der Woche wurden die Zellen auf Koloniebildung kontrolliert. Zu Beginn wurde, um eine ausreichende Zufuhr von Nährstoffen zu gewährleisten, frisches Medium hinzugegeben. Bei ersten sichtbaren Kolonien konnte dann ein Wechsel des Mediums durchgeführt werden. Im Durchschnitt konnten die Zellen nach 34,0 Tagen (*SD* = 7,6) das erste Mal passagiert und im Folgenden in T75-Zellkulturflaschen kultiviert werden. Das Splitt-Verhältnis betrug anfänglich 1 : 2. Nach etwa einem Monat wuchsen die FaDu-Zellen schneller und wurden dann in etwa zweimal pro Woche, bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % passagiert. Das Splitt-Verhältnis betrug hierbei zwischen 1 : 3 und 1 : 6, in Ausnahmen konnte es auch bei 1 : 2 oder 1 : 8 liegen. Zum Passagieren wurde zuerst das Medium mittels Pipette entfernt und verworfen und die FaDu-Zellen danach zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen. Dann wurden sie, um ihre Adhärenz am Flaschenboden aufzulösen, mit 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt und für etwa 7 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Ablösen der Zellen durch Klopfen an die Zellkulturflasche

unterstützt und am Mikroskop kontrolliert. Durch Hinzugeben von mindestens 2,5 ml Medium wurde die Hydrolyse unterbrochen und nach sorgfältigem Mischen eine bestimmte Menge der Zellsuspension, je nach geplantem Splitt-Verhältnis, in eine neue T75-Zellkulturflasche mit 10 ml vorbereitetem Medium überführt.

Wachstumskurve

Um das Wachstum der FaDu-Zellen für die nachfolgenden Versuche zu charakterisieren, wurden zu mehreren Zeitpunkten Wachstumskurven angefertigt. Dies ist eine einfache Methode zur Analyse des Wachstumsverhaltens von klonalen Zellpopulationen, die darin besteht die Zellen einer oder mehrerer Klone zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu zählen. Trägt man die bestimmten Zellzahlen in einem Koordinatensystem gegen die Zeit auf, erhält man die Wachstumskurve, als graphische Darstellung der Zellproliferation. Diese entspricht einer logarithmischen Vermehrung und erreicht, bedingt durch den begrenzten Platz des Zellkulturgefäßes, nach einer bestimmten Zeit ein Plateau. Es lässt sich, über die Berechnung der Verdopplungszeit der Klone, ebenfalls die Wachstumsrate bestimmen (Puck et al., 1956). Diese ist für die Planung des zeitlichen Umfangs der *in vitro* Experimente von Bedeutung.

Zur Erstellung der Wachstumskurven wurden jeweils fünf 6-Well-Zellkulturtestplatten (TPP *Techno Plastic Products AG*, Trasadingen, Schweiz) zum Auszählen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen vorbereitet. Auf jeder Testplatte wurden drei *Wells* mit je 3 ml einer Zellsuspension, mit bekannter Zellzahl (N_{WK}), welche zwischen $7,8 \cdot 10^4$ und $13 \cdot 10^4$ Zellen pro ml lag, befüllt. Zum Herstellen dieser Suspension mussten die FaDu-Zellen einer Zellkulturflasche mittels Neubauer-Zählkammer (*Neubauer improved Zählkammer*, Marienfeld Superior, Marienfeld Superior, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) gezählt werden. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die FaDu-Zellen, wie für das Passagieren, in Suspension gebracht und dann in ein 15 ml Reagenzröhrchen überführt. Nach sorgfältigem Mischen wurde ein kleiner Teil der Suspension in ein *Well* einer 96-Well-Zellkulturtestplatte (TPP *Techno Plastic Products AG*, Trasadingen, Schweiz) gegeben. Je 20 μ l wurden anschließend in zwei weitere *Wells* der Testplatte überführt und im Verhältnis 1 : 1 mit Trypanblau gemischt. Die gefärbte Lösung eines *Wells* wurde in eine Hälfte der Neubauer-Zählkammer pipettiert, sodass je vier Eckquadrate pro *Well* ausgezählt werden konnten. Die Zellzahl pro ml (N) wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$N = X * \frac{2}{4} * 10^4 \quad (3.5),$$

wobei X die insgesamt, in den vier Großquadraten, bestimmte Zellzahl bezeichnet. Für eine Wachstumskurve wurden 50 ml Zellsuspension hergestellt. Zuerst wurden hierfür 50 ml Medium in ein Reagenzröhrchen gegeben. Das für die Zellsuspension benötigte Volumen V der zuvor gezählten Zellen N (in Zellen pro ml) berechnete sich wie folgt:

$$V = \frac{N_{WK} * 50ml}{N} \quad (3.6).$$

Aus den 50 ml des sich bereits im Reagenzröhrchen befindlichen Mediums wurde dieses Volumen V entfernt und dann die gleiche Menge der vorbereiteten Zellen überführt. Nach sorgfältigem Mischen wurden, mithilfe einer *Multistep*-Pipette (Multipette® Plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), je 3 ml Zellsuspension in jeweils drei *Wells* pro 6-*Well*-Testplatte gegeben. Die Platten wurden bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO²-Gehalt von 5 % und einem Sauerstoffgehalt von 18,8 % inkubiert. Nach jeweils 24 Stunden wurde die mittlere Zellzahl aller drei *Wells* einer Testplatte bestimmt. Hierzu wurden für jedes *Well* zwei Neubauer-Zählkammern gezählt und der Mittelwert gebildet, um die mittlere Zellzahl zum

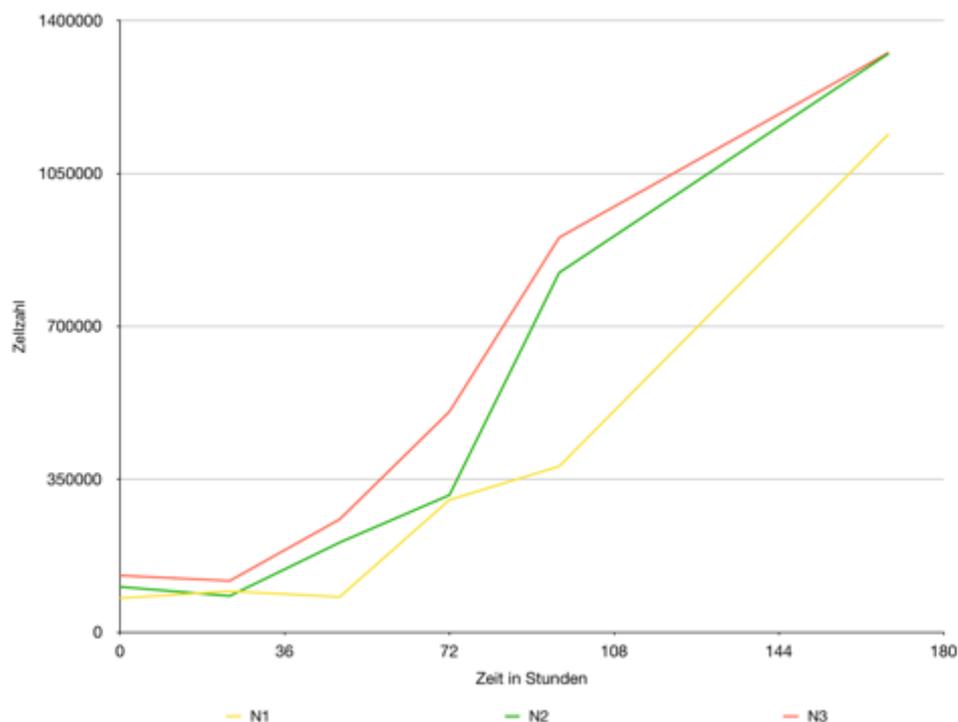


Abbildung 3.3 Wachstumskurven der FaDu-Zellen

Die Wachstumskurven wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten und mit verschiedenen Ausgangszellzahlen angefertigt, wobei N1 78.000 Zellen, N2 104.000 Zellen und N3 130.000 entsprach.

entsprechenden Zeitraum zu erhalten. Nur die letzte 6-Well-Testplatte wurde mit einem Abstand von 72 Stunden zur vorletzten, also nach insgesamt 168 Stunden, ausgezählt.

Die bestimmten Zellzahlen wurden in Abhängigkeit von der Zeit in ein Koordinatensystem eingetragen. Die Abbildung 3.3 zeigt alle drei zu unterschiedlichen Zeitpunkten angefertigten Wachstumskurven, während die Abbildung 3.4 eine gemittelte Wachstumskurve der drei Experimente abbildet. Die Verdopplungszeit (T_D) wurde mittels folgender Formel bestimmt:

$$T_D = \frac{\ln(2)}{\ln(N_t) - \ln(N_0)} * t \quad (3.7),$$

wobei N_t die zum Zeitpunkt t bestimmte Zellzahl und N_0 die ausgesäte Zellzahl (N_{WK} : zwischen $7,8 \cdot 10^4$ und $13 \cdot 10^4$ Zellen pro ml) bezeichnen. Die auf diese Weise bestimmte Verdopplungszeit der FaDu-Zellen betrug im Mittel 46,43 Stunden ($SD = 3,41$) und entsprach somit auch der von Rangan (1972) angegebenen Population-Verdopplungszeit von etwa 50 Stunden.

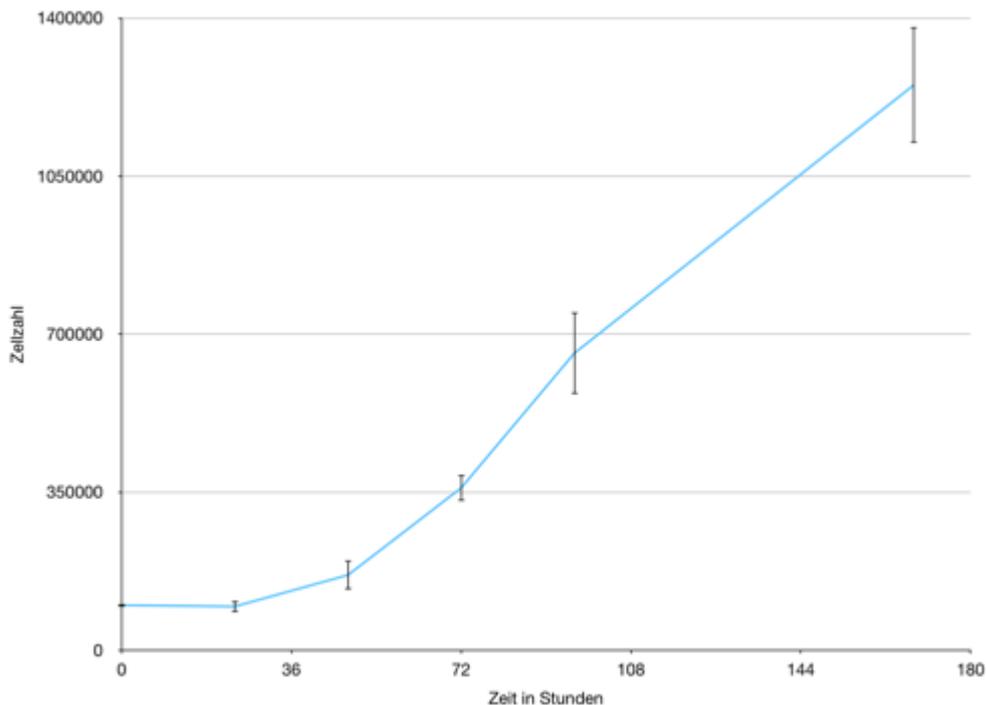


Abbildung 3.4 Gemittelte Wachstumskurve der FaDu-Zellen

Die ursprünglichen Kurven aus der Abbildung 3.3 wurden jeweils auf eine Ausgangszellzahl von $N_0 = 100.000$ transformiert und aus diesen dann die hier abgebildete durchschnittliche Wachstumskurve berechnet.

3.2.2 CFA

Im ersten Teil der *in vitro* Studie wurden die zuvor homogen sowie räumlich fraktioniert bestrahlten Versuchsgruppen bezüglich ihrer zellulären Überlebensraten nach Testbestrahlungen mit mehreren Dosen mit der Kontrollgruppe verglichen. So sollte eine Aussage über eine etwaig veränderte Strahlensensibilität nach einer vorausgehenden Strahlenbehandlung getroffen werden. Von Interesse waren zudem Unterschiede zwischen der homogen applizierten Dosis und der Behandlung mittels MRT, um den Nutzen dieser präklinischen Bestrahlungsform in den Kontext bestehender Radiotherapiekonzepte einordnen zu können.

A. Methode

Die für die Koloniebildungstests verwendeten Zellkonzentrationen wurden unter Zusammenschau mehrerer Parameter festgelegt. Zum einen existieren Richtwerte in der Literatur (Franken et al., 2006). Zum anderen dienten sowohl die zuvor ermittelte Verdopplungszeit der FaDu-Zellen von etwa 46 Stunden als auch vorbereitende CFA-Versuche mit unterschiedlichen Zellzahlen und Inkubationszeiten, welche gemeinsam mit Annique Dombrowsky durchgeführt wurden, als Orientierung. Die Koloniebildungstests innerhalb dieser Versuchsreihe wurden letztendlich mit sich verdoppelnden Zellkonzentrationen von 400 Zellen /ml bis 6.400 Zellen /ml durchgeführt, welche nach einer Inkubationszeit von 13 Tagen fixiert und gefärbt wurden. Das Aussäen der Zellen erfolgte auf je sechs 12-Well-Zellkulturtestplatten (TPP *Techno Plastic Products* AG, Trasadingen, Schweiz). Auf zwei der Testplatten wurden die Zellen mit einer Konzentration von 400 Zellen /ml ausgesät. Auf den anderen jeweils mit einer Konzentration von 800 Zellen /ml, 1.600 Zellen /ml, 3.200 Zellen /ml oder 6.400 Zellen /ml. Zum Herstellen der Zellsuspensionen mit diesen festgelegten Konzentrationen, wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt. Hierzu wurden fünf 50 ml Reagenzröhrchen vorbereitet, von denen eines mit 30 ml Medium und die anderen vier mit jeweils 15 ml Medium befüllt wurden. Im Anschluss wurde die Zellzahl N der zu analysierenden Zellen, wie zuvor beschrieben, mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nun konnte das Volumen V berechnet werden, welches aus der Zellsuspension in das Reagenzröhrchen mit 30 ml Medium überführt werden musste, um die Suspension mit der höchsten Konzentration von 6.400 Zellen /ml für den CFA herzustellen.

Dazu wurde folgende Formel benutzt:

$$V = \frac{6.400 \text{ Zellen/ml} * 30 \text{ ml}}{N} \quad (3.8).$$

Das errechnete Volumen V wurde zunächst aus den vorbereiteten 30 ml Medium des ersten Reagenzröhrchens entfernt und dann das gleiche Volumen nach sorgfältigem Mischen aus der Zellsuspension in das Reagenzröhrchen überführt. Für die Verdünnungsreihe wurden die überführten Zellen mit einer Pipette gründlich suspendiert und dann jeweils 15 ml in das nachfolgende Reagenzröhrchen überführt, sodass sich die Zellzahl in jedem Schritt halbierte, bis im letzten Reagenzröhrchen 30 ml Zellsuspension mit einer Konzentration von 400 Zellen/ml entstanden. Mithilfe einer *Multistep*-Pipette wurden anschließend je 1 ml der jeweiligen Suspension in jedes *Well* einer mit der entsprechenden Konzentration beschrifteten 12-*Well*-Testplatte gegeben. Die Testplatten wurden 20 – 24 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO²-Gehalt von 5 % sowie einem Sauerstoffgehalt von 18,8 % inkubiert. Diese Zeitspanne erlaubte es den FaDu-Zellen sich an den Boden der Testplatten anzuheften. Im nächsten Schritt wurden die Zellen auf den Testplatten mit aufsteigenden Dosen bestrahlt: Als Kontrolle für die Ausplattierungseffizienz diente jeweils eine Testplatte mit 400 Zellen/ml, welche unbestrahlt blieb. Jeweils eine weitere Testplatte mit einer Konzentration von 400 Zellen/ml wurde mit 1 Gy bestrahlt. Testplatten mit einer Konzentration von 800 Zellen/ml erhielten eine Dosis von 2 Gy und solche mit einer Konzentration von 1.600 Zellen/ml eine Dosis von 4 Gy. Die Testplatten mit einer Konzentration von 3.200 Zellen/ml wurden mit 6 Gy bestrahlt und jene mit 6.400 Zellen/ml mit 8 Gy. Die Bestrahlungen erfolgten bis Juli 2017 an der Bestrahlungsanlage *Gulmay RS225* (damals *Gulmay Medical*, jetzt *Xstrahl Limited*, Camberley, Vereinigtes Königreich) des Klinikums rechts der Isar (70 kV, 10 mA, Filter: Aluminium 3 mm, Bestrahlungsdauer für eine Dosis von 1 Gy: 61 s). Bedingt durch die Hygienevorschriften der Versuchstierhaltung konnten sie nicht durch mich stattfinden und wurden größtenteils durch Theresa Urban und Fiona Hellmundt durchgeführt. Der Neuaufbau des Zentrums für Präklinische Forschung (ZPF) als Teil des Zentralinstituts für Translationale Krebsforschung der Technischen Universität München (TranslaTUM) führte jedoch dazu, dass die Bestrahlungseinheit nach diesem Zeitpunkt für die Versuchsreihe nicht mehr zugänglich war. Eine Alternative fand sich im Februar 2018 mit einer neueren Generation des Röntgenbestrahlungsgerätes *Xstrahl RS225* (*Xstrahl Limited*, Camberley, Vereinigtes Königreich) am Helmholtz Zentrum München in Neuherberg (70 kV, 30 mA, Filter: Aluminium 3 mm, Bestrahlungsdauer für eine Dosis von 1 Gy: 91 s). Die Dosimetrie an der neuen Bestrahlungseinheit erfolgte durch Dr. Stefan Bartzsch. Nachdem diese erfolgreich abgeschlossen war, konnte die Versuchsreihe der CFA fortgeführt werden.

Nach einer Inkubationsdauer von 13 Tagen nach dem Ausplattieren der Zellen, wurde das Wachstum aller Zellen der dem CFA zugehörigen Testplatten gestoppt und die Zellen fixiert.

Hierzu musste zuerst das Medium aus den *Wells* entfernt werden. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann für fünf Minuten mit -20 °C kaltem reinen Methanol bedeckt. Nach entfernen des Methanols, mussten die Platten, bevor sie gefärbt werden konnten, bei Raumluft getrocknet werden. Dann wurden die Zellen am Boden der Testplatten für drei Minuten mit Kristallviolett 0,1 % (aus eigener Herstellung am Klinikum rechts der Isar) bedeckt. Nach dem Entfernen der Färbelösung wurden die Platten vorsichtig mit Leitungswasser gewaschen und anschließend wieder bei Raumluft getrocknet. Dieses Protokoll wurde für alle erfolgreich zurück in die Zellkultur überführten Zelllinien jeweils mindestens dreimal umgesetzt. Die Digitalisierung und Auswertung der Platten erfolgte mit dem elektronischen Kolonie- und Sphäroidzähler *GelCount™* (*Oxford Optronix Ltd.*, Abingdon, Vereinigtes Königreich) und der dazugehörigen Software.

B. Statistische Analyse: Surviving fraction und Überlebens-Dosis-Kurven

Die pro *Well* erkannte Anzahl an Kolonien wurde für jeden CFA aller analysierten Zelllinien in einer eigenen Kalkulationstabelle in *Numbers* (Version 6.1, *Apple Inc.* Cupertino, USA) dokumentiert. Für jede Dosis gab es, entsprechend der Anzahl an *Wells* pro Testplatte, jeweils zwölf Werte, die die Anzahl der aus den ausgesäten Zellen entstandenen Kolonien abbildeten. Wurde diese mit der initial ausgesäten Zellzahl ins Verhältnis gesetzt, errechnete sich daraus die Ausplattierungseffizienz jedes einzelnen *Wells* (PE_x):

$$PE_x = \frac{N_k}{N_z} * 100 \quad (3.9).$$

wobei N_k die gezählte Anzahl an Kolonie und N_z , die bekannte initial ausgesäte Anzahl an Zellen darstellten. Für jeden CFA wurde die mittlere PE der unbestrahlten Zellkulturplatte als Referenz-PE (PE_0) bestimmt. Anschließend wurden die PE aller bestrahlten *Wells* (PE_x , mit X = Nummer des entsprechenden *Wells*) durch diese dividiert, um die Fraktion der überlebenden Zellen für jedes *Well* zu berechnen (SF_x , mit X = Nummer des entsprechenden *Wells*):

$$SF_x = \frac{PE_x}{PE_0} \quad (3.10).$$

Per Definition betrug die SF für alle unbestrahlten Testplatten also 1,00. Innerhalb jeder Versuchsgruppe wurde für jede applizierte Bestrahlungsdosis eine mittlere SF aus den entsprechenden SF_x aller Koloniebildungstests der der Gruppe zugehörigen Zelllinien inklusive ihrer Standardabweichung bestimmt. Die SF als Anteil derjenigen Zellen, welche nach der Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen noch ihre Fähigkeit zur Reproduktion behalten hatten, konnte somit zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen verglichen werden, um eine etwaige Veränderung der Strahlensensibilität zu erkennen. Um in die Analyse des

Zellüberlebens mit eingeschlossen zu werden, mussten die Koloniebildungstests mehrere Kriterien erfüllen. Zum einen sollte die durchschnittlich pro *Well* ermittelte Koloniezahl mindestens zehn betragen ($N_k \geq 10$). Weiterhin mussten für jede Testplatte mindestens die Hälfte der *Wells* auswertbar sein ($N_w \geq 50\%$). Schließlich wurden Tests ausgeschlossen, bei denen die SF nicht, wie zu erwarten, mit steigender Dosis und besonders im Vergleich zur unbestrahlten Kontroll-Testplatte, abnahm, da dieses abweichende Verhalten auf äußere Einflüsse oder Fehler bei der Aussaat zurückgeführt werden musste.

Um das Zellüberleben (S) zudem in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis (D) graphisch in Form von Überlebenskurven abzubilden, wurde eine linear-quadratische Regression nach der Formel

$$S(D) = e^{-(\alpha \cdot D + \beta \cdot D^2)} \quad (3.11)$$

durchgeführt und die Sensitivitätskoeffizienten α und β für jede Versuchgruppe bestimmt. Dabei steht α für den Dosiseffekt pro Gy und β für den Dosisquadrat-Effekt pro Gy². Die Regression erfolgte in R (R Version 4.0.2, *The R Foundation*, Wien, Österreich, <https://www.r-project.org/about.html>) nach der *Maximum-Likelihood*-Methode. Die Unterschiede zwischen den errechneten α - und β -Werten wurden anschließend in R mittels ANOVA F-Test jeweils zwischen der Kontrollgruppe und jeder bestrahlten Versuchsgruppe auf statistische Signifikanz hin überprüft (Brasemann et al., 2015 und Brasemann, 2020). Für weitere statistische Tests hinsichtlich der ermittelten Ausplattierungseffizienzen und Überlebensfraktionen wurde *jamovi* (*The jamovi project 2020. jamovi* Version 1.2., <https://www.jamovi.org>) verwendet. Die gruppenspezifischen Mittelwerte der Ausplattierungseffizienz (PE) und des Anteils der überlebenden, kolonienbildenden Zellen (SF) wurden mittels einfaktorieller Varianzanalysen auf statistisch signifikante Unterschiede mit $\alpha < .05$ überprüft. Bei einem $p < .05$ wurden weiterführende Post-hoc-Tests durchgeführt, um festzustellen, genau welche gruppenspezifischen Werte sich statistisch voneinander unterschieden.

Noch vor der eigentlichen statistischen Auswertung der Ergebnisse fand jedoch ein Vergleich der beiden Teilanalysen, welche an den beiden unterschiedlichen Bestrahlungseinheiten durchgeführt werden mussten, statt, um eine Vergleichbarkeit sicher zu stellen. Verglichen wurden sowohl die gruppenspezifischen Ausplattierungseffizienzen als auch die SF. Hierdurch sollten mehrere Aspekte berücksichtigt werden: einerseits kann das längerfristige Arbeiten mit Zelllinien in Zellkultur genetische Veränderungen der Zellen begünstigen, was beispielsweise auch Veränderungen des Wachstumsverhaltens nach sich ziehen kann. In diesem Kontext konnten eine erhöhte Wachstumsrate sowie eine aggressivere Proliferation beobachtet werden

(Torsvik et al., 2014). Sollte die zeitliche Verzögerung trotz dem vorherigen zeitnahen Einfrieren der Zellen zu einem solchen Effekt geführt haben, könnte die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der zweizeitig durchgeführten CFA beeinträchtigt worden sein. Andererseits sollte ausgeschlossen werden, dass sich die an beiden Geräten erzeugte Strahlung qualitativ unterschied, um valide Aussagen zur gruppenspezifischen Strahlensensibilität der Zellen treffen zu können.

3.2.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Mittels der Technik der Fluoreszenz in situ Hybridisierung sollten die molekularbiologischen Effekte der an der MuCLS generierten Röntgen-(Mikro)strahlen untersucht werden. Der entstandene zytogenetische Schaden wurde anhand der Analyse von Insertionen, Translokationen und azentrischen Chromosomen evaluiert.

A. Methode

In situ Hybridisierung

Das für diese Arbeit eingesetzte Protokoll entspricht den Hinweisen des Herstellers *MetaSystems Probes*, von dem die verwendeten FISH-Sonden *XCiting Chromosome Paints (XCP) 2 - green* und *4 - orange* (*MetaSystems Probes GmbH, Altlussheim, Deutschland*) stammen. Mit ihnen wurden die Chromosomen zwei, in grün, und vier, in orange, angefärbt. Für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung mussten die entsprechenden FaDu-Zellen mit 0,02 µl/ml Medium Colcemid (KaryoMax® Colcemid 10 µg/ml, *Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland*) 19 Stunden lang in der Zellkulturflasche vorbehandelt werden. Der Spindelinhibitor führte zu einem Mitosearrest in der Metaphase, welches eine Voraussetzung für das Hybridisieren mit den fluoreszierenden Sonden darstellte. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die auf diese Weise präparierten Zellen mittels Trypsin-EDTA-Lösung aus der Zellkulturflasche gelöst und mit 10 ml Medium in ein 15 ml Reagenzröhrchen überführt. In diesem mussten sie bei Raumtemperatur und einer Beschleunigung von 100 g für 10 min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde bis auf 0,5 ml abgenommen und verworfen. In dem übrig gebliebenen Medium wurde das Pellet resuspendiert. Die nachfolgende Zugabe von 6 ml Kaliumchlorid 0,075 M (KCl) (*Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland*) erfolgte tropfenweise in ständiger Bewegung auf dem Vortexmischer. Die hypotone Lösung führte zu einer osmotischen Lyse der Zellen und dazu, dass die in den Zellkernen enthaltenen Chromosomen für die FISH verfügbar wurden. Die so entstandene Suspension musste für 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert werden. Anschließend wurde sie erneut bei

Raumtemperatur und einer Beschleunigung von 100 g für 10 min zentrifugiert. Auch dieses Mal konnte der Überstand bis auf 0,5 ml abgenommen und verworfen werden. Das Pellet wurde im zurückbleibenden Medium resuspendiert. Im nächsten Schritt musste die Suspension mit einem Fixiermittel mehrfach gewaschen werden. Das entsprechende Fixativ wurde hierfür schon im Voraus aus hundertprozentiger Essigsäure und hundertprozentigem Ethanol, in einem Verhältnis von 1 : 3 hergestellt und musste für die Verwendung $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kalt sein. Der Suspension wurden 5 ml dieses Fixativs tropfenweise, in ständiger Bewegung durch den Vortexmischer, hinzugegeben. Die Mischung musste für 20 min auf Eis gestellt werden, bevor sie mit einer Beschleunigung von 100 g für 10 min zentrifugiert werden konnte. Nachdem dieser Waschschrift mindestens fünfmal durchgeführt worden war, wurde der Überstand nach dem letzten Zentrifugieren komplett entfernt und das Pellet in wenig Fixativ resuspendiert. Die so in der Metaphase fixierten Chromosomen konnten entweder direkt weiterverarbeitet oder zunächst bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden.

Der nächste Schritt in der Vorbereitung der Chromosomen auf die Hybridisierung mit den FISH-Sonden war das Auftropfen von jeweils zweimal $2\text{ }\mu\text{l}$ der Suspension auf mehrere Objektträger (Menzel™ Gläser, *Thermo Fisher Scientific*, Schwerte, Deutschland). Diese wurden anschließend lufttrocknen gelassen. Die zu verwendenden Objektträger mussten zur Vorbereitung fünf Minuten lang mit lauwarmen Leitungswasser und im Anschluss ebenfalls für fünf Minuten mit destilliertem Wasser gespült werden. Über Nacht wurden sie bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer Mischung aus Wasser mit 4 % Methanol gelagert. Auch auf den Objektträgern konnten die Chromosomen vor der folgenden Färbung entweder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zwischengelagert oder sofort weiterbehandelt werden. In jedem Fall wurden sie durch Annique Dombrowsky durch einen Buchstabencode versehen, damit die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop durch mich später verblindet geschehen konnte.

Das Färben erfolgte an zwei aufeinander folgenden Tagen. Es musste im Dunkeln stattfinden, da die Sonden photosensibel sind. Die Chromosomen wurden lichtmikroskopisch auf dem Objektträger lokalisiert und der Bereich, in dem sie sich befanden, mit einem Permanentmarker markiert. In diesen Bereich wurden die Sonden aufgebracht. Abhängig von seiner Größe konnte entweder eine Fläche von $20\text{ mm} \cdot 20\text{ mm}$ oder von $24\text{ mm} \cdot 32\text{ mm}$, welches den möglichen Deckglasgrößen (Menzel™ Mikroskop-Deckgläschen, *Thermo Fisher Scientific*, Schwerte, Deutschland) entsprach, benetzt werden. Für kleinere Bereiche wurden $6\text{ }\mu\text{l}$ der orange leuchtenden und $14\text{ }\mu\text{l}$ der grün leuchtenden Sonden verwendet. Für größere jeweils $8\text{ }\mu\text{l}$ der orangenen Sonden beziehungsweise $18\text{ }\mu\text{l}$ der grünen. Die Objektträger wurden anschließend mit den entsprechenden Deckgläsern versehen, welche mittels elastischem Montagekleber

(*Fixogum*, Marabu, Marabu GmbH & Co. KG, Tamm, Deutschland) an den Rändern luftdicht verschlossen wurden. So konnten sie zur Denaturierung der auf ihnen befindlichen DNA für 2 min auf eine 75 °C warme Heizplatte gelegt werden. Im Anschluss mussten sie über Nacht bei 37 °C in einer Feuchtekammer inkubiert werden, um die Hybridisierung zwischen den DNA-Einzelsträngen und den komplementären Sonden zu ermöglichen.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger mit SSC-Puffer (20× SSC Buffer, *Gibco*TM, *Thermo Fisher Scientific*, Schwerte, Deutschland), *Tween*®20 (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, München, Deutschland) und destilliertem Wasser gewaschen. Hierzu wurden das Fixogum und die Deckgläser vorsichtig entfernt. Der erste Waschschrift erfolgte für 2 min in 0,4 × SSC-Puffer bei 72 °C in einem Wasserbad. Die Temperatur wurde hierbei laufend mit einem analogen Thermometer überwacht. Es folgte eine 30 s lange Behandlung in 2,0 × SSC-Puffer mit 0,05 % *Tween*®20 bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Objektträger kurz in destilliertes Wasser getaucht und dann lufttrocknen gelassen. Das Gegenfärben der DNA, welche nicht durch die Sonden gebunden wurde, erfolgte durch eine Applikation von etwa 10 µl DAPI mit *Antifade* (*Vectashield*® *HardSet*TM *Antifade Mounting Medium w/DAPI*, *Vector Laboratories*, Burlingame, CA, USA). Nun konnten die Objektträger wieder mit einem Deckglas versehen werden, welches an den Rändern mit durchsichtigem Nagellack fixiert wurde. In diesem Zustand konnten sie bis zu sechs Monate bei – 20 °C gelagert und mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet werden. Für jede Ziellinie wurden mindestens drei Färbungen à drei Objektträgern angefertigt. Die Fixierungen und Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit Annique Dombrowsky und Negar Mehrabi durchgeführt.

Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Analyse der markierten Chromosomen erfolgte manuell mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (*Axio Vert.A1*, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Für jede Ziellinie sollten die Chromosomen von 500 Metaphase-Zellkernen beurteilt werden. Sichtbare Zellkerne mussten mehrere Kriterien erfüllen, um in die Analyse eingeschlossen zu werden. Sie sollten frei mit genügend Abstand zu benachbarten Gruppen von Chromosomen liegen und sich mit diesen nicht überlappen. Die Gruppierungen der Chromosomen mussten als einem Zellkern angehörig erkennbar sein. Dabei sollten die einzelnen Chromosomen zum einen zumindest so nah beieinander liegen, dass die Gruppierung das Sichtfeld nicht überschritt. Zum anderen sollten sie vereinzelt liegen und sich untereinander nicht überschneiden, um eindeutig voneinander distinguiert werden zu können. Um als Zellkern gewertet zu werden mussten außerdem mindestens 40 Chromosomen gruppiert beieinander liegen sowie zumindest jeweils

ein Signal für beide Fluorochrome vorhanden sein. Chromosomen-Gruppierungen mit drei oder mehr Kopien beider fluoreszenzmarkierter Chromosomen wurden von der Analyse ausgeschlossen, da nicht sicher unterschieden werden konnte, ob es sich um einen polyploiden Chromosomensatz oder aber um zwei oder mehr sich überlagernde Zellkerne hielt. Ein weiteres Einschlusskriterium stellte die adäquate Intensität des Fluoreszenzsignals dar, welche sich deutlich vom Hintergrund und von denen mit DAPI gegengefärbten Chromosomen unterscheiden lassen musste.

Die Auswertung selbst wurde in einer Ecke des Deckglases begonnen. Der Blick verlief dann mäanderförmig von oben nach unten und von einer Seite zur anderen. Diese Technik erleichterte es, die Orientierung auf dem Objektträger zu behalten und so das Risiko von Mehrfachwertungen der Metaphase-Zellkerne zu minimieren. Für jede Gruppe von Chromosomen wurden mehrere Merkmale untersucht und dokumentiert. Zuerst wurde die Anzahl der Signale beider Fluorochrome bestimmt und Mono- und Trisomien der Chromosomen zwei und vier („*Mono grün*“; „*Mono orange*“; „*Tri grün*“; „*Tri orange*“) notiert. Dann wurden potentielle Translokationen mit Beteiligung der fluoreszenzmarkierten Chromosomen untersucht, welche sich als Zweifarbigkeit der Chromosomen darstellte. Hier bestand einerseits die Möglichkeit von Translokationen zwischen den Chromosomen zwei und vier untereinander, die als Chromosomen mit grünen und orangenen Abschnitten sichtbar waren („*T orange-grün*“). Andererseits zeigten sich Chromosomen mit orangenen und blauen („*T blau-orange*“) beziehungsweise grünen und blauen Abschnitten („*T blau-grün*“), welche das Vorhandensein von Translokationen zwischen Chromosom zwei oder vier und einem anderen, mit DAPI in blau gegengefärbten, Chromosom anzeigten. Als nächstes wurde nach Insertionen („*I*“) gesucht, welche sich durch einen andersfarbigen Abschnitt innerhalb eines Chromosoms bemerkbar machten. Mögliche Kombinationen waren hierbei einerseits ein orangener Abschnitt in einem grünen Chromosom sowie ein orangener Abschnitt in einem blauen Chromosom, welche für Insertionen von Sequenzen des Chromosoms vier in ein anderes Chromosom sprachen. Andererseits waren grüne Abschnitte in einem orangenen oder blauen Chromosom denkbar, welche ihrerseits eine Insertion einer Sequenz des Chromosoms zwei in ein anderes Chromosom anzeigten. Auch blaue Abschnitte in den fluoreszenzmarkierten Chromosomen zwei und vier stellten eine Möglichkeit dar und standen für eine Insertion einer fremden Sequenz in die farblich gekennzeichneten Chromosomen. Häufige Aberrationen stellten zudem azentrische Chromosomen dar. Gewertet wurden die am sichersten erkennbaren und am häufigsten dokumentierten. Dies waren azentrische Fragmente (AF), welche sowohl einen orangenen als auch einen grünen Anteil aufwiesen. Möglich waren ein Anteil von

Chromosom zwei und einer von Chromosom vier („*AF 1O-1G*“), sowie zwei Fragmente von Chromosom zwei mit jeweils einem („*AF 1O-2G*“) oder zwei Fragmenten von Chromosom vier („*AF 2O-2G*“).

Zur Dokumentation aller dieser Merkmale wurde ein tabellarisches Protokoll (*score sheet*) angefertigt⁹. Jede Zelllinie wurde auf einem eigenen *Score Sheet* dokumentiert. Für jeden bewerteten Zellkern konnten hier, in einer eigenen Zeile, Striche in den Spalten gemacht werden, welche den oben beschriebenen Kategorien zugeordnet waren. Es wurden ausschließlich von mir mikroskopisch ausgewertete Obejektträger in die Analyse eingeschlossen, um den statistischen Fehler trotz genauer Beurteilungskriterien möglichst klein zu halten.

B. Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurden die manuell auf den *Score Sheets* erfassten Daten in einer Kalkulationstabelle in *Numbers* (Version 6.1, *Apple Inc.* Cupertino, USA) für jede codierte Zelllinie zusammengefasst. Im Anschluss wurden die Datenreihen mittels dem zuvor von Annique Dombrowsky festgelegten Schlüssel den richtigen Zelllinien und Versuchsgruppen zugeordnet. Um alle Zelllinien untereinander vergleichbar zu machen, wurde die Anzahl der chromosomalen Aberrationen jeweils anteilig für 100 Zellen berechnet.

Die statistische Analyse der so erstellten prozentualen Daten wurde mit *jamovi* (*The jamovi project 2020*, *jamovi* Version 1.2, <https://www.jamovi.org>) durchgeführt. Sowohl aus der Anzahl der verschiedenen Translokationen als auch aus derjenigen der unterschiedlichen azentrischen Chromosomen wurde für jede Zelllinie die Summe der insgesamt beobachteten Translokationen („*T gesamt*“) und azentrischen Fragmente („*AF gesamt*“) berechnet. Zusätzlich wurden der jeweilige prozentuale Anteil jeder Ausprägung der beiden Merkmale an ihrer Gesamtsumme bestimmt. Für jede Kategorie („*T blau-grün*“; „*T blau-orange*“; „*T orange-grün*“; „*T gesamt*“; „*T% blau-grün*“; „*T% blau-orange*“; „*T% orange-grün*“; „*I*“; „*AF 1O-1G*“; „*AF 1O-2G*“; „*AF 2O-2G*“; „*AF gesamt*“; „*AF% 1O-1G*“; „*AF% 1O-2G*“; „*AF% 2O-2G*“; „*Mono grün*“; „*Mono orange*“; „*Tri grün*“; „*Tri orange*“) wurden ein Gruppenmittelwert (*MW*) mit seiner Standardabweichung (*SD*) ermittelt. Alle Datenreihen wurden mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests und des Levene-Tests auf Abweichungen von einer angenommenen Normalverteilung beziehungsweise eine homogene Varianz überprüft, um festzulegen mittels welcher Analyse die Ergebnisse auf ihre statistische Signifikanz hin

⁹ Zur leichteren Veranschaulichung der Auswertung, findet sich ein beispielhafter Ausschnitt eines solchen *Score Sheets* im Anhang (Abbildung A.1).

untersucht werden konnten. Es kamen sowohl einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) als auch individuelle t-Tests zum Einsatz.

4 Ergebnisse

4.1 Tumorwachstumsverzögerung

Insgesamt konnten 27 Versuchstiere in die Analyse der Tumorwachstumsverzögerung eingeschlossen werden. Von den initial 44 Mäusen entwickelten 36 einen Tumor, was einer allgemeinen Erfolgsquote von 81,8 % entsprach. Innerhalb der ersten Gruppe von Mäusen, welche im Januar 2017 vorbereitet wurden, waren es zwei Mäuse, in welchen keine Tumoren heranwuchsen. So lag die Quote hier sogar bei 94,3 % und damit weitaus höher als in der zweiten Gruppe, welche im April 2017 als zusätzliche Kontrollgruppe diente. Hier entwickelten sich in nur drei der neun Versuchstiere Tumoren (33,3 %). Acht, der sich insgesamt ausbildenden Tumoren, erreichten nicht das Fünfzehnfache ihres Ausgangsvolumens, den Endpunkt des Versuches, und mussten deshalb aus der Analyse ausgeschlossen werden. Zwei von ihnen wurden als durch die Bestrahlung kontrolliert gewertet, da ihr finales Volumen unterhalb ihres Ausgangsvolumens lag ($V_{rel} < 1$). Dies betraf jeweils einen Tumor beider homogen bestrahlten Gruppen. Von den anderen Tumoren, welche nicht bis auf das Zielvolumen heranwuchsen, gehörten fünf zur Kontrollgruppe sowie einer zur 5 Gy MRT-Gruppe. Weiters wurde ein Tumor fehlerhaft bestrahlt und musste deshalb ebenfalls aus der Untersuchung ausgeschlossen werden. Die Kontrollgruppe bestand somit insgesamt aus vier Mäusen, von denen jeweils zwei „schein-bestrahlt“ beziehungsweise nicht bestrahlt wurden. Weiters konnten für beide homogen bestrahlten Gruppen jeweils fünf, sowie für die 5 Gy MRT-Gruppe sechs und für die 3 Gy MRT-Gruppe sieben Tumoren in die Analyse aufgenommen werden. Die jeweiligen Gruppengrößen sind in der Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1 Anzahl der Tumoren die in die Analyse der Wachstumsverzögerung eingeschlossen werden konnten eingeschlossen werden konnten

| Gruppe | Tumore |
|--------------|--------|
| Kontrolle | 4 |
| 3 Gy homogen | 5 |
| 3 Gy MRT | 7 |
| 5 Gy homogen | 5 |
| 5 Gy MRT | 6 |

Durchschnittlich dauerte es 14,53 Tage ($SD = 6,11$), bis die Neoplasien nach der Tumorzellinjektion das erste Mal vermessen werden konnten. Das durchschnittliche Ausgangsvolumen lag bei $1,61 \text{ mm}^3$ ($SD = 0,36$). Die Zeitdauer bis zum Erreichen der für die Bestrahlung notwendigen Größe und adäquaten Durchblutung war sehr variabel. Im Mittel lag der zeitliche Abstand zwischen der ersten Messung und dem Bestrahlungszeitpunkt bei 5,72 Tagen ($SD = 7,18$; Minimum = 0; Maximum = 32).

Zeitspannen bis zum Erreichen des Zielvolumens

Für die Tumoren der Kontrollgruppe, für die ein exponentielles Wachstum angenommen wurde, ergab sich mittels Regressionsanalyse der Messdaten eine mittlere Zeit von 23,0 Tagen ($SD = 4,68$) bis sie das Fünfzehnfache ihres Ausgangsvolumens erreicht hatten. Die vier analysierten Tumoren wiesen ein eher heterogenes Wachstum auf. Zwei von ihnen benötigten mit 27,27 Tagen beziehungsweise 26,44 Tagen ähnlich lang, bis sie den Endpunkt erreichten. Die anderen beiden Tumoren wuchsen mit 20,90 Tagen und 17,40 Tagen deutlich schneller. Abbildung 4.1 zeigt sowohl eine Gegenüberstellung des Wachstums aller vier Tumoren, die als Kontrollen dienten, als auch die Regressionskurve als ihr gruppenspezifisches durchschnittliches Wachstumsverhalten.

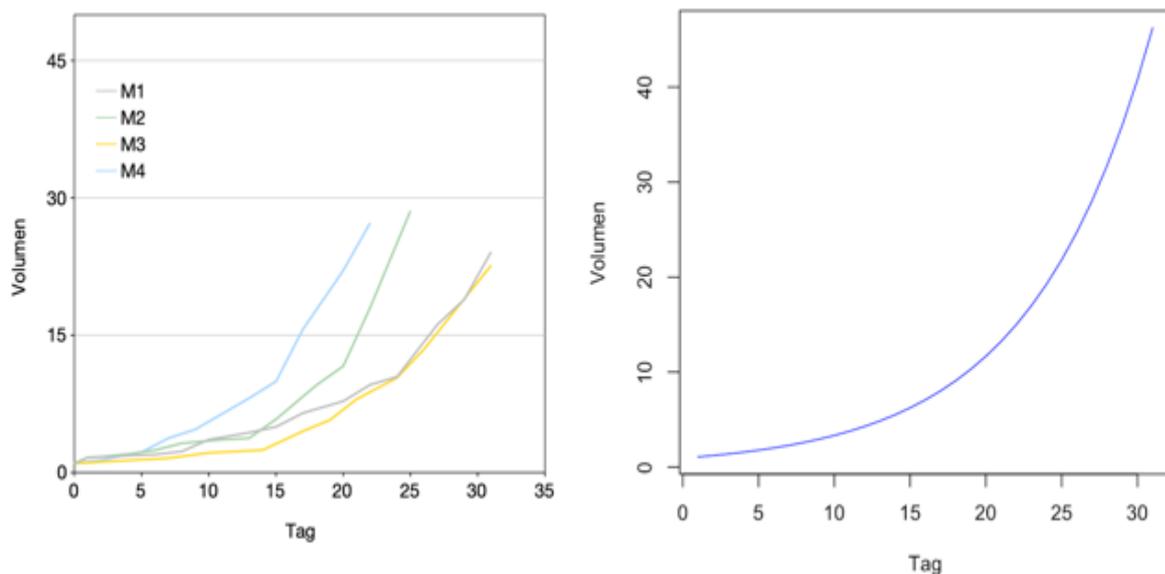


Abbildung 4.1 Tumorwachstumskurven der Kontrollgruppe

In (a) wird das spezifische Wachstum der vier Tumoren, die als Kontrollen dienten graphisch verglichen. Die Regressionskurve ihres durchschnittlichen Wachstums ist in (b) dargestellt. Die durchschnittlichen Werte der Koeffizienten ($\pm SEM$) betragen für $\alpha = 0,956 \pm 0,187$ und für $\beta = 0,125 \pm 0,012$. Die Kontrolltumoren erreichten im Durchschnitt ihr fünfzehnfache Volumen nach 23,0 Tagen ($SD = 4,68$).

Beide mit 3 Gy bestrahlten Versuchsgruppen zeigten ein ähnliches, nur minimal von dem der Kontrollgruppe abweichendes, Wachstum. Die Tumoren, welche zuvor homogen mit 3 Gy bestrahlt worden waren, benötigten durchschnittlich 24,16 Tage ($SD = 7,88$), um auf das Zielvolumen heranzuwachsen. Für diejenigen Tumoren, an welche die gleiche Dosis mittels Röntgen-Mikrokanälen abgegeben worden war, betrug diese Zeitspanne im Mittel 24,10 Tage ($SD = 6,68$). Das Wachstumsverhalten war auch in diesen beiden Gruppen sehr variabel. Unter den homogen mit 3 Gy bestrahlten Tumoren fanden sich zwei, die ihr Ausgangsvolumen sehr schnell, nach 16,90 Tagen beziehungsweise 18,20 Tagen erreichten, während ein dritter, mit einer Wachstumsdauer von 20,91 Tagen, ein moderates Wachstum zeigte. Das Wachstum der anderen zwei war mit 29,76 Tagen sowie 35,02 Tagen deutlich langsamer. Eine ähnliche

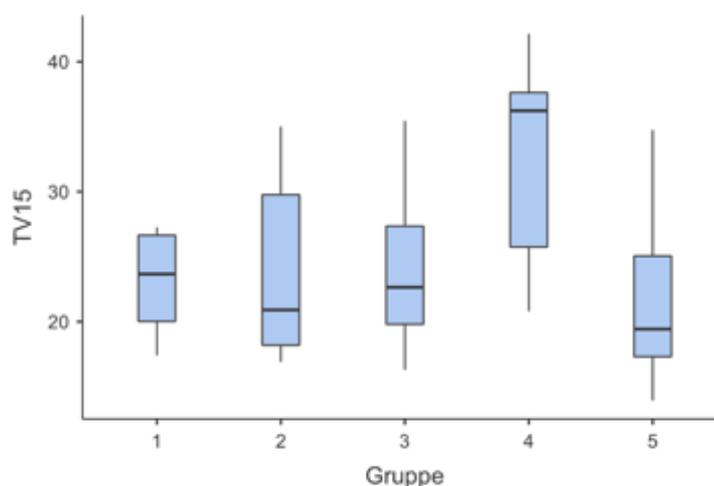


Abbildung 4.2 Vergleich der Zeitpunkte des Erreichens des Zielvolumens (T_{V15}) aller Gruppen

In den Boxplots sind jeweils der Median sowie die Quartilsabstände des Zeitpunktes T_{V15} für jede Gruppe dargestellt. Aufgrund der recht hohen Streuung der Daten innerhalb der Gruppen lagen die Mediane sowohl beider mit 3 Gy bestrahlter Gruppen (2) homogen und (3) MRT als auch derjenige der 5 Gy MRT-Gruppe (5), im Gegensatz zu den im Text beschriebenen Mittelwerten, knapp unterhalb desjenigen der Kontrollen (1): (1) 23,67 Tage, (2) 20,91 Tage, (3) 22,65 Tage und (5) 19,43 Tage. Auch diese Abweichungen zeigten sich allerdings statistisch jeweils nicht signifikant, sodass für alle vier Gruppen ein sehr ähnliches Wachstum angenommen werden konnte. Im Gegensatz hierzu lag der mediane T_{V15} der homogen mit 5 Gy bestrahlten Tumoren (5) mit 36,23 Tagen deutlich oberhalb des für die Kontrollgruppe berechneten Wertes. Dieser Unterschied näherte sich einem statistisch signifikanten Ergebnis an ($p = .096$), sodass die Vermutung nahe liegt, dass eine an der MuCLS homogen applizierte Dosis von 5 Gy zu einer Wachstumsverzögerung der FaDu-Tumoren geführt haben könnte.

Verteilung zeigte sich auch in der 3 Gy MRT-Gruppe. Ein Tumor wies mit einer Dauer von 16,30 Tagen bis zum Erreichen des Zielvolumens ein sehr schnelles Wachstum auf. Vier Tumoren wuchsen mit eher moderater Geschwindigkeit von durchschnittlich 22 Tagen (19,26; 20,35; 22,65; 24,41) und zwei deutlich langsamer mit 30,29 Tagen beziehungsweise 35,45 Tagen. Nach einer homogenen Bestrahlung mit 5 Gy konnte ein vergleichsweise

langsames Tumorwachstum beobachtet werden. Tumoren dieser Gruppe benötigten im Schnitt 32,51 Tage ($SD = 8,88$), um ihr Zielvolumen zu erreichen. Drei der Tumoren benötigten mit 36,23 Tagen, 37,62 Tagen beziehungsweise 42,15 Tagen besonders lang, während zwei ein

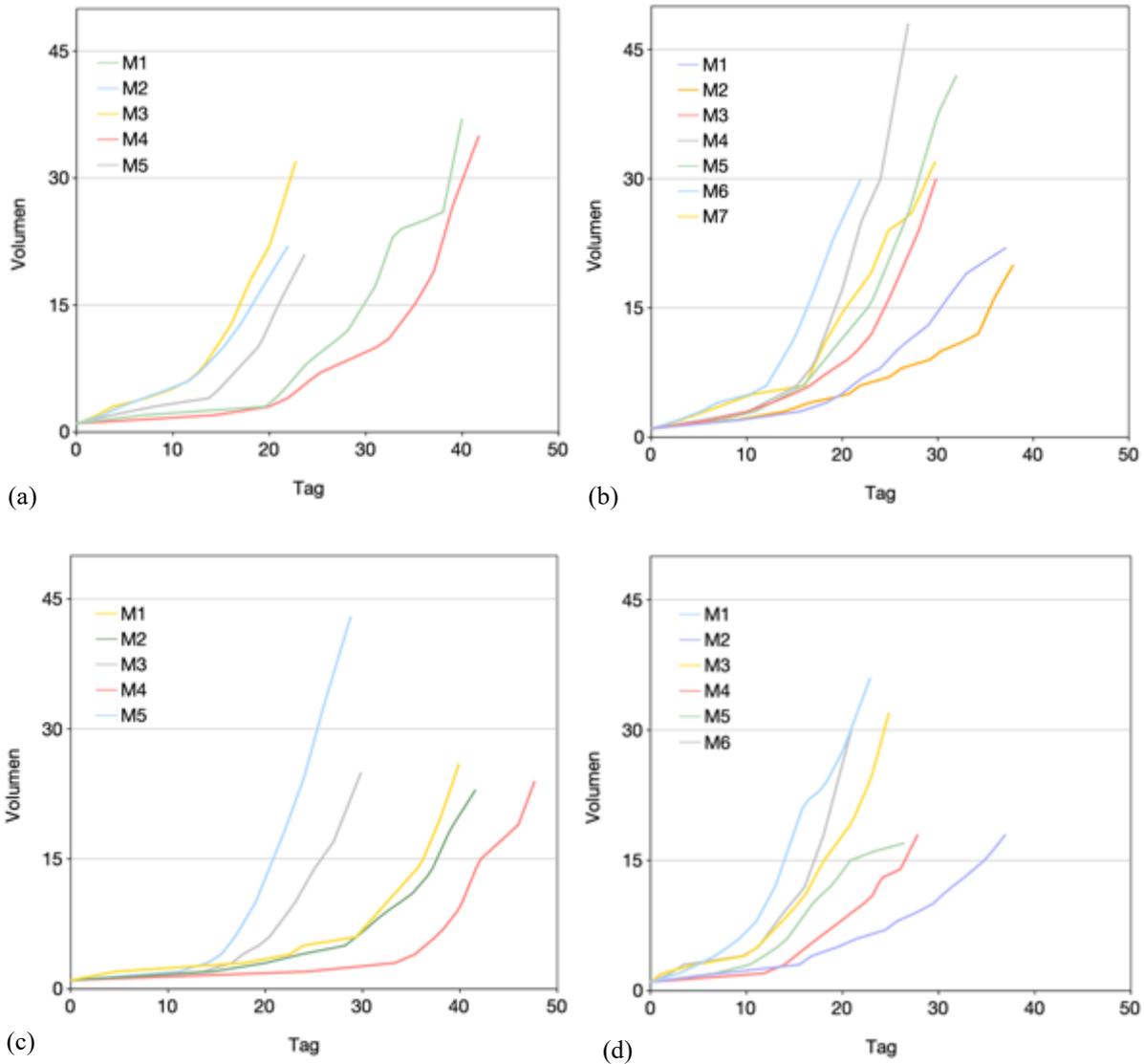


Abbildung 4.3 Wachstumskurven der unterschiedlich bestrahlten Tumore

Die mit 3 Gy bestrahlten Tumoren wiesen unabhängig von der Bestrahlungsart (a) homogen und (b) MRT eine ähnliche durchschnittliche Wachstumsdauer von 24,16 Tagen bzw. 24,10 Tagen bis zum Erreichen des Zielvolumens auf. Auch die Streuung der Daten beider Gruppen ähnelte sich stark. Bei den mit 3 Gy homogen bestrahlten Tumoren lag die Zeitspanne zwischen 16,90 Tagen (M3) und 35,02 Tagen (M4). Für die Tumoren, welche die gleiche Dosis mittels MRT erhalten hatten, lag sie zwischen 16,30 Tagen (M6) und 35,45 Tagen (M2). Hierbei entsprach die kürzeste Zeitdauer beider Gruppen in etwa derjenigen, welche für die Kontrollen beobachtet werden konnte, wohingegen die längsten Zeitspannen etwa 9 Tage oberhalb derjenigen der Kontrollgruppe lagen. Im Gegensatz hierzu zeigte sich der Anstieg fast aller Wachstumskurven der mit 5 Gy homogen bestrahlten Tumoren deutlich flacher. In der dieser Gruppe lag die Zeit, die die Tumoren bis zum Erreichen ihres fünfzehnfachen Ausgangsvolumens benötigten im Mittel bei 32,51 Tagen (c). Wobei der am schnellsten wachsende Tumor dieses bereits nach 20,81 Tagen erreichte (M5), der langsamste allerdings 42,15 Tage benötigte (M4). Im Gegensatz hierzu fand sich in der 5 Gy MRT-Gruppe keine Veränderung der Kurvenanstiege (d). Tumoren dieser Gruppe benötigten zwischen 13,93 Tagen (M1) und 34,75 Tagen (M2) bis sie den Endpunkt erreicht hatten. Ihr Durchschnitt lag bei 21,85 Tagen.

moderateres Wachstum, mit einer Zeitspanne von durchschnittlich 23 Tagen (20,81; 25,75) bis zum Erreichen ihres Endvolumens, zeigten. Überraschenderweise zeigten die Tumoren der 5 Gy MRT-Gruppe ein deutlich schnelleres Wachstum. Für sie lag die Zeitspanne bis zum Erreichen des Fünfzehnfachen ihres Ausgangsvolumens unterhalb derjenigen der mit 3 Gy bestrahlten Tumoren und betrug sogar weniger als die der Kontrollgruppe. Im Mittel dauerte es 21,85 Tage ($SD = 7,6$) bis sie den Endpunkt erreicht hatten. Drei der Tumoren zeigten mit einer Zeitspanne von 13,93 Tagen, 17,06 Tagen beziehungsweise 18,06 Tagen ein sehr schnelles Wachstum, während zwei weitere in einer moderaten Geschwindigkeit über 20,80 Tage beziehungsweise 26,48 Tage heranwuchsen. Nur ein Tumor wies mit einer Dauer von 34,75 Tagen bis zum Erreichen seines Zielvolumens ein verlangsamtes Wachstum auf. Die Abbildung 4.2 vergleicht graphisch alle gruppenspezifischen T_{V15} -Werte inklusive ihrer Streuung. Abbildung 4.3 stellt die Wachstumskurven der einzelnen Tumoren aller bestrahlten Versuchsgruppen vergleichend gegenüber.

Tumorwachstumsverzögerung

Aus der Differenz der Zeiträume, die die bestrahlten Gruppen im Mittel brauchten, um das Zielvolumen zu erreichen (T_{V15X}), und desjenigen der Kontrollgruppe (T_{V15K}) konnte für jede Gruppe eine Verzögerung des Wachstums gegenüber den unbestrahlten Tumoren (T_D) berechnet werden (Formel 3.4). Für die homogen mit 3 Gy bestrahlten Tumoren lag diese bei 1,16 Tagen ($SD = 7,88$). Die Tumoren, an die eine Dosis von 3 Gy mittels Röntgen-Mikrostrahlen abgegeben worden war, erreichten das Fünfzehnfache ihres Ausgangsvolumens etwa 1,10 Tage ($SD = 6,68$) später als die Kontrollgruppe. Eine weitaus größere Verzögerung, mit durchschnittlich 9,51 Tagen ($SD = 8,88$), zeigten diejenigen Tumoren, die homogen mit 5 Gy bestrahlt worden waren. Unerwarteterweise erreichten die Tumoren, welche eine MRT mit 5 Gy erhalten hatten, ihr Zielvolumen im Mittel 1,15 Tage ($SD = 7,6$) schneller als die unbestrahlten Kontrollen. Für die Unterschiede der T_{V15} zwischen den bestrahlten Tumoren und der Kontrollgruppe zeigten sich individuell durchgeführte t-Test nach Student jeweils nicht signifikant ($p > .05$). Jedoch näherte sich die Wachstumsverzögerung der 5 Gy homogen-Gruppe im Vergleich mit den Kontrollen mit einem p-Wert von .096 einer statistischen Signifikanz an. Die Unterschiede des mittleren Wachstumsverhaltens aller Gruppen untereinander sind graphisch in Form von gruppenspezifischen Wachstumskurven abschließend in Abbildung 4.4 zusammengefasst.

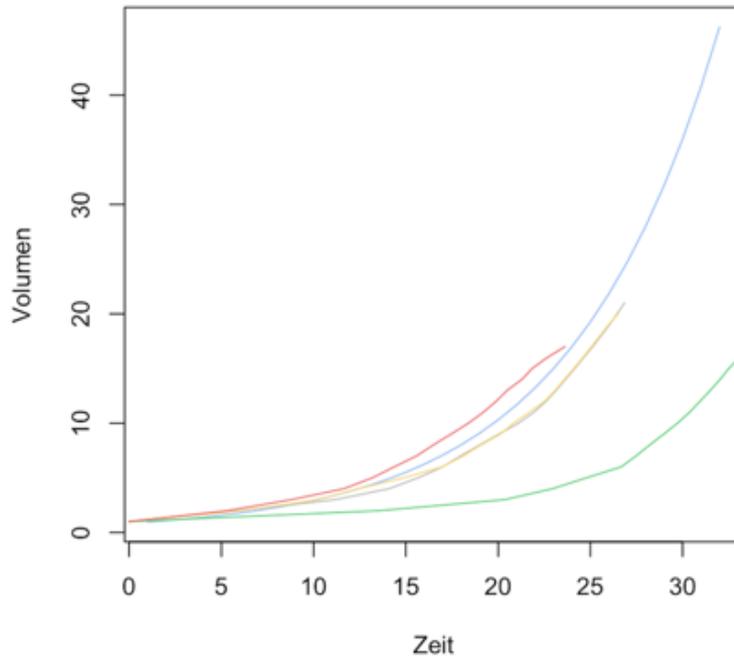


Abbildung 4.4 Vergleich der mittleren Wachstumskurven aller Gruppen

[Blau – Kontrolle, Grau – 3 Gy homogen, Gelb – 3 Gy MRT, Grün – 5 Gy homogen, Rot – 5 Gy MRT]

Die blaue Kurve stellt das Wachstum der Kontrolltumoren nach der Formel $V = \alpha \cdot e^{(\beta \cdot \text{Zeit})}$ dar, wobei die mittleren Koeffizienten ($\pm SEM$) bei $\alpha = 0,956 (\pm 0,187)$ und $\beta = 0,125 (\pm 0,012)$ lagen. Sowohl die Wachstumskurve beider mit 3 Gy bestrahlter Gruppen, grau = homogen und gelb = MRT, als auch diejenige der Tumore, welche eine MRT mit 5 Gy erhalten hatten (rot) bilden ein der Kontrollgruppe sehr ähnliches Wachstums ab. Die grüne Kurve hingegen, welche das Wachstum derjenigen Tumoren zeigt, welche mit 5 Gy homogen bestrahlt worden waren, weicht deutlich von allen anderen ab. Die Zeitverzögerung im Vergleich zum Wachstum der Kontrollgruppe näherte sich mit einem mittels t-Test ermittelten p-Wert von .096 einem statistisch signifikanten Ergebnis an.

Zusammenfassung

Für die Betrachtung der Wachstumsverzögerung konnten insgesamt 27 Tumoren analysiert werden. Davon machten jeweils zwei „schein-bestrahlte“ und zwei unbestrahlte Tumoren die Kontrollgruppe aus, während beide homogen bestrahlte Gruppen aus jeweils fünf, sowie die mittels MRT mit 3 Gy behandelte Gruppe aus sieben und die mittels MRT mit 5 Gy behandelte Gruppe aus sechs Tumoren bestanden. Das Wachstum beider mit 3 Gy bestrahlten Gruppen sowie das der räumlich fraktioniert mit 5 Gy bestrahlten Gruppe unterschieden sich nicht wesentlich von demjenigen der Kontrollen. Die Kontrolltumoren erreichten nach durchschnittlich 23,0 Tagen das Fünfzehnfache ihres Ausgangsvolumens. Für diejenigen Tumoren, welche homogen mit 3 Gy bestrahlt worden waren lag dieser Wert mit 24,16 Tagen und für solche, welche dieselbe Dosis räumlich fraktioniert erhalten hatten mit 24,10 Tagen

leicht oberhalb der Zeitspanne der Kontrollgruppe. Der Wert der Tumoren, welche eine MRT mit 5 Gy erhalten hatten, betrug mit 21,85 Tagen, etwas weniger als diese. Für diese unwesentlichen Abweichungen zeigten individuell durchgeführte t-Tests kein statistisch signifikantes Ergebnis, sodass von einem ähnlichen Wachstumsverhalten aller vier genannten Gruppen ausgegangen werden kann. Eine Wachstumsverzögerung konnte für die heterotopen FaDu-Tumoren somit, nach einer Bestrahlung mit 3 Gy, unabhängig von der Bestrahlungsart, sowie nach einer räumlich fraktionierten Bestrahlung mit 5 Gy, nicht beobachtet werden. Im Vergleich hierzu wich das Wachstumsverhalten der mit 5 Gy homogen bestrahlten Tumoren deutlich von demjenigen der Kontrollgruppe ab. Diese Tumoren erreichten ihr Zielvolumen durchschnittlich 9,51 Tage später als die Kontrolltumoren. Der Zeitpunkt, an dem sich ihr Ausgangsvolumen verfünzfach hatte, lag im Mittel bei 32,51 Tagen. Dieser Unterschied näherte sich mit einem, ebenfalls durch einen t-Test ermittelten, p-Wert von .096 einer statistischen Signifikanz an.

4.2 Strahlensensibilität: Klonogenes Überleben nach Bestrahlung in vitro

Gruppengröße und Anzahl der Koloniebildungstests

Das klonogene Zellüberleben nach einer Bestrahlung konnte mithilfe des Koloniebildungstests für insgesamt 25 Zelllinien untersucht werden. Das entspricht allen Tumorzelllinien, die nach Abschluss der Analyse der Tumorstadiumsverzögerung erfolgreich isoliert werden konnten. Für die Kontrollgruppe war es möglich drei Zelllinien einzuschließen. Davon entsprang eine einem zuvor „schein-bestrahlten“ Tumor und zwei jeweils unbestrahlten Tumoren. Die Isolation blieb für Zellen aus drei der ursprünglich fünf „schein-bestrahlten“ Tumoren und für solche aus einem der ursprünglich drei unbestrahlten Tumoren aufgrund einer geringen Tumorgröße erfolglos. Von jeweils einem Tumor beider Untergruppen konnten initial erfolgreich Zellen in die Kultur überführt, jedoch nicht dauerhaft in vitro erhalten werden. In beiden zuvor homogen bestrahlten Gruppen wurde jeweils ein Tumor durch die Behandlung kontrolliert. Es war jedoch möglich, für alle Tumoren, welche das Zielvolumen erreicht hatten, erfolgreich Zellen zu isolieren und in vitro zu kultivieren. So konnten für beide jeweils fünf Zelllinien in die Analyse mittels Koloniebildungstest eingeschlossen werden. Auch aus den sieben zuvor mit 5 Gy fraktioniert bestrahlten Tumoren konnten fünf Zelllinien isoliert und mittels CFA untersucht werden. Die anderen zwei Tumoren wuchsen nur auf eine geringe Größe heran und eine Isolation der Zellen blieb ohne Erfolg. Im Gegensatz hierzu gelang es, aus allen Tumoren, welche eine Bestrahlung mit 3 Gy Röntgen-Mikrokanälen erhalten hatten,

Zellen zu isolieren und in eine dauerhafte Zellkultur zu überführen. So konnten für diese Gruppe sieben Zelllinien in die CFA-Analyse eingeschlossen werden.

Von allen isolierten Zelllinien wurden insgesamt 124 Koloniebildungstests durchgeführt. Davon wurden 70 an der Bestrahlungsanlage *Gulmay RS225* (damals *Gulmay Medical*, jetzt *Xstrahl Limited*, Camberley, Vereinigtes Königreich) des Klinikums rechts der Isar (70 kV, 10 mA, Filter: Aluminium 3 mm, Bestrahlungsdauer für eine Dosis von 1 Gy: 61 s) bestrahlt, welches der Einfachheit halber im Weiteren als „*Gulmay*“ bezeichnet werden wird. Die Bestrahlung der anderen 54 CFA fand am Röntgenbestrahlungsgerät *Xstrahl RS225* (*Xstrahl Limited*, Camberley, Vereinigtes Königreich) am Helmholtz Zentrum München in Neuherberg (70 kV, 30 mA, Filter: Aluminium 3 mm, Bestrahlungsdauer für eine Dosis von 1 Gy: 91 s) statt, auf das im Folgenden als „*Xstrahl*“ Bezug genommen wird. Unter Berücksichtigung des Einschlusskriteriums, dass pro *Well* aller sechs Testplatten eines CFA durchschnittlich mindestens zehn Kolonien ($N_k \geq 10$) detektiert werden mussten, war es nötig 37 Koloniebildungstests auszuschließen. Zusätzlich konnten drei weitere Tests nicht in die Auswertung eingeschlossen werden, da mindestens für eine Testplatte weniger als sechs *Wells* ($N_w < 50\%$) auswertbar waren. Somit war es möglich für 84 der 124 durchgeführten Koloniebildungstests (67,7 %) mit der Analyse des Zellüberlebens zu beginnen und die PE sowie die dosisabhängige SF zu bestimmen. Von ihnen wurde knapp über die Hälfte am Klinikum rechts der Isar ($N = 44$) durchgeführt, während die anderen ($N = 40$) später am

Tabelle 4.2 Anzahl der Zelllinien und Koloniebildungstests die in die Analysen von PE und SF eingeschlossen werden konnten.

| Gruppe | Zelllinien | CFA |
|--------------|------------|-----|
| Kontrolle | 3 | 6 |
| 3 Gy homogen | 5 | 19 |
| 3 Gy MRT | 7 | 24 |
| 5 Gy homogen | 5 | 18 |
| 5 Gy MRT | 5 | 17 |

Helmholtz Zentrum bestrahlt wurden. Für zwei Zelllinien der Kontrollgruppe sowie für eine der 3 Gy MRT-Gruppe konnten nur am Helmholtz Zentrum bestrahlte Zellen analysiert werden. Weiterhin war es für jeweils eine Zelllinie sowohl beider Versuchsgruppen, welche mit 3 Gy bestrahlt worden waren, als auch solcher, die eine homogene Dosis von 5 Gy erhalten hatten, sowie für zwei Zelllinien der 5 Gy MRT-Gruppe ausschließlich möglich CFA, welche am Klinikum rechts der Isar bestrahlt worden waren, in die Auswertung einzuschließen. Die

Berechnungen von PE und SF wurden somit für sechs Koloniebildungstests der Kontrollgruppe, 19 CFA der mit 3 Gy homogen bestrahlten Zellen, 24 CFA der 3 Gy MRT-Gruppe, 18 CFA der mit 5 Gy homogen bestrahlten Zellen sowie 17 CFA der 5 Gy MRT-Gruppe durchgeführt. Im Schnitt wurden für jede Zelllinie 3,4 Koloniebildungstests in die Analyse eingeschlossen (Min = 1, Max = 6). Die beschriebene Zusammensetzung der einzelnen Gruppen ist in der Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Der Vergleich der vorläufigen Ergebnisse beider CFA-Versuchsreihen zeigte allerdings deutliche Abweichungen der gruppenspezifischen Mittelwerte von PE und SF. Dies machte es unmöglich alle Daten direkt zu vergleichen und gemeinsam auszuwerten. Da der Stichprobenumfang für beide Studienzeiträume, mit 44 CFA in der ersten Versuchsreihe aus dem Jahr 2017 und 40 CFA innerhalb der zweiten Versuchsreihe 2018, ungefähr gleich war und sich auch die Gruppengrößen in etwa entsprachen, wurden beide Datensätze zunächst getrennt evaluiert und im Anschluss miteinander verglichen. Diese Untersuchung sollte zeigen, ob sie in Hinblick auf das klonogene Überleben, als Ausdruck der Strahlensensibilität der einzelnen Gruppen, dennoch ähnliche Aussagen zuließen.

4.2.1 CFA-Versuchsreihe 2017

Ausplattierungseffizienz

Für die durchschnittliche PE der Kontrollgruppe konnten für die 2017 durchgeführten Koloniebildungstests zwei CFA ausgewertet werden, während es für die mit 5 Gy homogen bestrahlten Zellen neun und für alle anderen Gruppen elf waren. Die Ausplattierungseffizienz der unbehandelten Testplatten lag für alle Versuchsgruppen zwischen 6 % und 11 %. Die, unabhängig von der Bestrahlungsart, mit 5 Gy behandelten Tumorzellen zeigten hierbei gegenüber den nicht beziehungsweise „schein“-bestrahlten Kontrollzelllinien und jenen Zellen, die mit 3 Gy bestrahlt worden waren, eine höhere PE. Für die Kontrollgruppe lag diese bei 6,50 % ($SD = 5,22$), für die Gruppe der Zellen, welche mit 3 Gy homogen bestrahlt worden waren, bei 6,14 % ($SD = 3,26$) und für die 3 Gy MRT-Gruppe bei 6,95 % ($SD = 3,02$). Die mit 5 Gy homogen bestrahlten Zellen wiesen eine durchschnittliche PE von 8,15 % ($SD = 5,52$) auf, während die 5 Gy MRT-Gruppe mit 10,59 % ($SD = 4,21$) die höchste Ausplattierungseffizienz zeigte. Die unterschiedlichen Gruppenmittelwerte der PE werden in der Abbildung 4.5 graphisch verglichen. Zusätzlich ist die Streuung der Daten der Ausplattierungseffizienzen für jede Gruppe in der Abbildung 4.6 dargestellt. Denn die Varianz der PE der verschiedenen Zelllinien innerhalb der einzelnen Gruppen war teilweise sehr hoch. Für die Kontrollgruppe konnte nur eine Zelllinie in die Analyse eingeschlossen werden, die PE

der einzelnen *Wells* schwankte dennoch zwischen $< 1,00\%$ und $16,00\%$. Auch die Schwankungen der zelllinienspezifischen PE innerhalb der anderen Gruppen lagen in einem ähnlichen Rahmen. Innerhalb der Zelllinien aus den Tumoren, welche zuvor homogen mit 3 Gy bestrahlt worden waren, gab es eine mit einer niedrigen PE von $2,97\%$, drei mit einer mittleren PE von jeweils $5,15\%$, $6,33\%$ und $6,70\%$ sowie eine weitere mit einer höheren PE von $8,28\%$. Eine ähnliche Verteilung wies auch die Ausplattierungseffizienz der Tumorzellen auf, welche mittels Mikrostrahlen mit 3 Gy bestrahlt worden waren. Eine Zelllinie zeigte eine niedrige PE von $2,56\%$, während vier eine mittlere PE um $6,50\%$ ($5,09\%$, $6,57\%$, $7,34\%$ und $7,63\%$) aufwiesen und eine weitere eine hohe PE mit $10,33\%$ zeigte. Vergleichsweise fanden sich bei beiden zuvor mit 5 Gy bestrahlten Gruppen durchschnittlich höhere Ausplattierungseffizienzen. Innerhalb der mit 5 Gy homogen bestrahlten Gruppe war die Streuung der Daten allerdings besonders hoch. Hier fanden sich zwei Zelllinien mit einer niedrigen PE von $1,83\%$ und $4,34\%$ sowie eine mit einer mittleren PE von $6,00\%$. Zwei weitere wiesen mit $10,69\%$ und $12,13\%$ eine jeweils hohe PE auf. Innerhalb der 5 Gy MRT-Gruppe konnten hingegen ausschließlich hohe Ausplattierungseffizienzen dokumentiert werden. Drei Zelllinien hatten eine mittlere PE um $8,50\%$ ($8,09\%$, $8,61\%$ und $9,07\%$), während zwei mit jeweils $13,84\%$ und $14,22\%$ die höchsten PE zeigten.

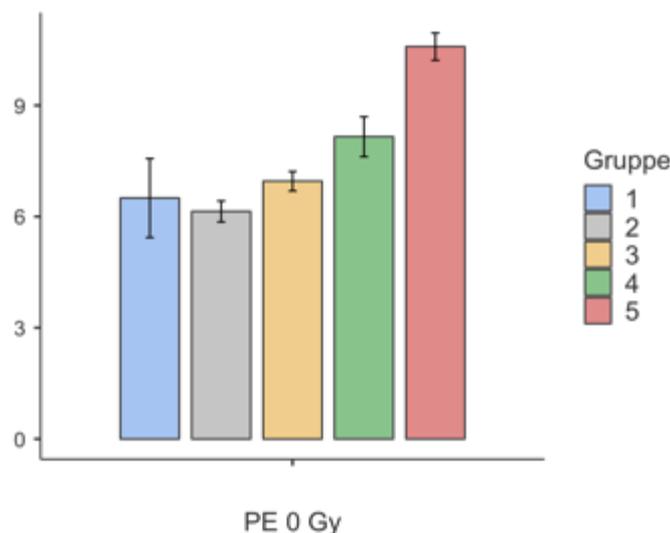


Abbildung 4.5 Mittlere Ausplattierungseffizienzen aller Gruppen in der CFA-Versuchsreihe 2017

Die PE der Kontrollgruppe (1) lag bei $6,50\%$. Beide mit 3 Gy bestrahlten Gruppen wiesen eine ähnliche PE auf: die der homogen bestrahlten Gruppe (2) betrug $6,14\%$ und die der räumlich fraktioniert bestrahlten Zellen (3) $6,95\%$. Die PE der Gruppe, welche homogen mit 5 Gy bestrahlt worden war (4) lag mit $8,15\%$ etwas höher, unterschied sich allerdings nicht signifikant von denjenigen, der zuvor genannten Gruppen. Die PE der 5 Gy MRT-Gruppe lag hingegen mit $10,59\%$ signifikant über den PE aller anderen Versuchsgruppen.

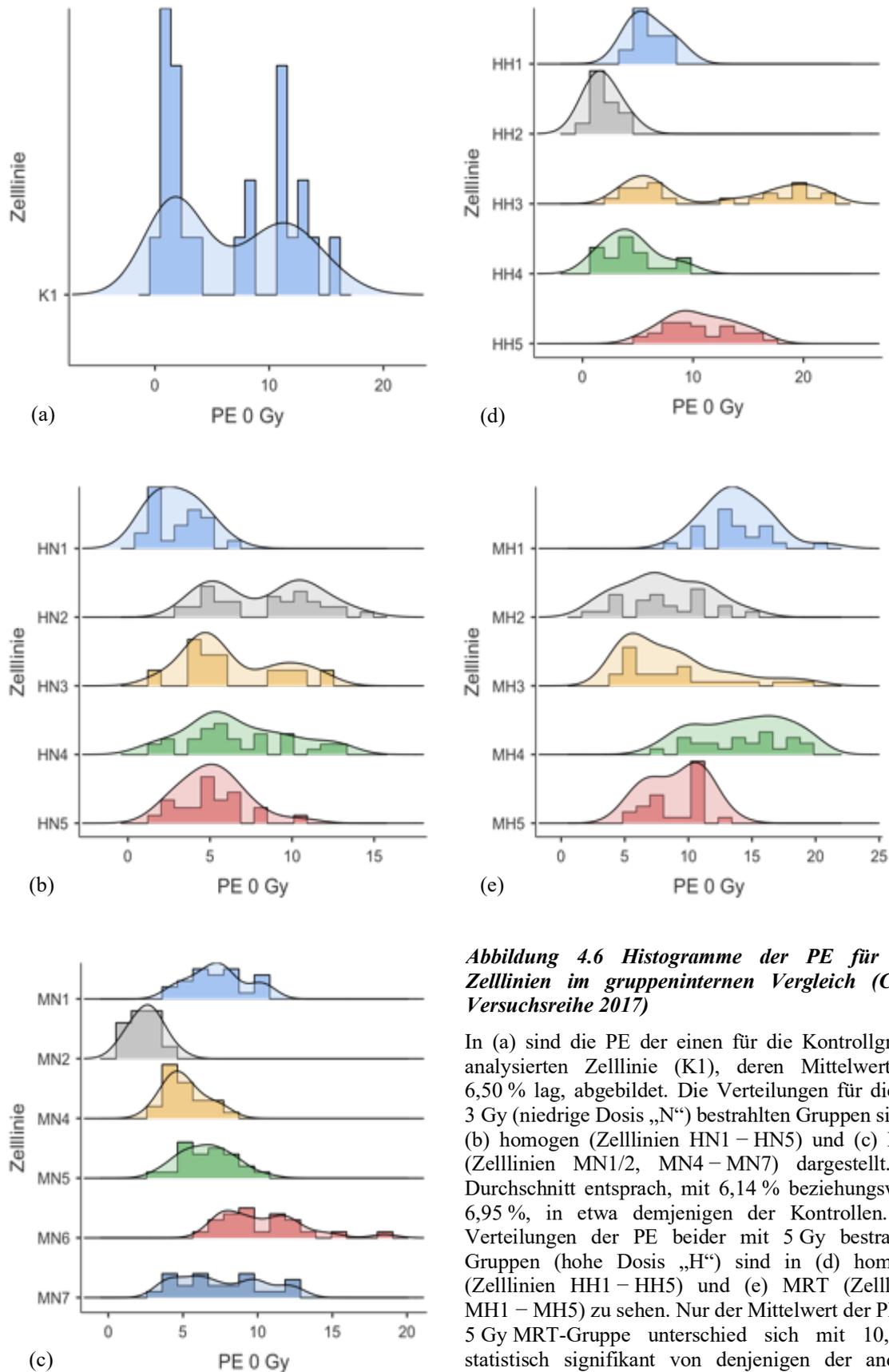


Abbildung 4.6 Histogramme der PE für alle Zelllinien im gruppeninternen Vergleich (CFA-Versuchsreihe 2017)

In (a) sind die PE der einen für die Kontrollgruppe analysierten Zelllinie (K1), deren Mittelwert bei 6,50 % lag, abgebildet. Die Verteilungen für die mit 3 Gy (niedrige Dosis „N“) bestrahlten Gruppen sind in (b) homogen (Zelllinien HN1 – HN5) und (c) MRT (Zelllinien MN1/2, MN4 – MN7) dargestellt. Ihr Durchschnitt entsprach, mit 6,14 % beziehungsweise 6,95 %, in etwa demjenigen der Kontrollen. Die Verteilungen der PE beider mit 5 Gy bestrahlten Gruppen (hohe Dosis „H“) sind in (d) homogen (Zelllinien HH1 – HH5) und (e) MRT (Zelllinien MH1 – MH5) zu sehen. Nur der Mittelwert der PE der 5 Gy MRT-Gruppe unterschied sich mit 10,59 % statistisch signifikant von denjenigen der anderen Gruppen.

Für die Datenreihen konnte, laut Shapiro-Wilk-Test und Levene-Test, weder eine Normalverteilung (Shapiro-Wilk: $W = 0.973$; $p < .001$) noch eine Homogenität der Varianzen (Levene: $F(4/519) = 16.390$; $p < .001$) angenommen werden. In einer einfaktoriellen Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis zeigten sich die Unterschiede der gruppenspezifischen PE statistisch signifikant ($\chi^2(4) = 76,84$; $p < .001$). Anschließend durchgeführte paarweise Vergleiche nach Dwass-Steel-Critchlow-Fligner konnten lediglich signifikante Unterschiede zwischen den mittels einer MRT mit 5 Gy bestrahlten Zellen und allen anderen Versuchgruppen feststellen (Kontrolle: $W = 4,76$; $p = .007$; 3 Gy homogen: $W = 11,77$; $p < .001$; 3 Gy MRT: $W = 9,98$; $p < .001$; 5 Gy homogen: $W = 6,14$; $p < .001$). Für die Unterschiede zwischen den PE der anderen Gruppen konnte keine statistische Signifikanz gefunden werden (jeweils $p > .05$).

Überlebensfraktion

Nach dem Berechnen der SF für alle aus der Versuchsreihe von 2017 vorerst eingeschlossenen Koloniebildungstests, mussten weitere 25 CFA aus der Analyse ausgeschlossen werden, deren Überlebensfraktion nicht, wie zu erwarten, kontinuierlich mit steigender Dosis abnahm. In den meisten Fällen überschritt die SF der 2 Gy Dosis Testplatten, diejenige, der mit 1 Gy bestrahlten Platte, oder die SF der mit 1 Gy oder 2 Gy behandelten Testplatten lag oberhalb derjenigen der unbestrahlten Kontroll-Testplatte. Es musste angenommen werden, dass dieser abweichende Verlauf am wahrscheinlichsten auf Fehler in der Aussaat oder auf äußere Einflüsse durch den Transport zurückzuführen war. Deshalb konnten diese abweichenden Datenreihen nicht in die Analyse eingeschlossen werden.

Tabelle 4.3 Anzahl der Zelllinien und CFA die in die Analyse der Daten aus der Versuchsreihe 2017 eingeschlossen werden konnten

| Gruppe | Plattierungseffizienz | | Überlebensfraktion | |
|--------------|-----------------------|-----|--------------------|-----|
| | Zelllinien | CFA | Zelllinien | CFA |
| Kontrolle | 1 | 2 | 1 | 1 |
| 3 Gy homogen | 5 | 11 | 3 | 6 |
| 3 Gy MRT | 6 | 11 | 6 | 11 |
| 5 Gy homogen | 5 | 9 | 4 | 6 |
| 5 Gy MRT | 5 | 11 | 5 | 9 |

Anmerkung: Aufgrund eines abweichenden Verlaufs der dosisspezifischen SF, der am wahrscheinlichsten auf Ungenauigkeiten während der Aussaat oder auf äußere Einflüsse durch den Transport der Zellen zurück zu führen war, mussten von der Berechnung der mittleren SF der Gruppen weitere CFA ausgeschlossen werden.

Somit bestand die finale Stichprobengröße der Analyse aus 33 Koloniebildungstests. Davon gehörte nur einer zur Kontrollgruppe. Jeweils sechs bildeten beide homogen bestrahlten Versuchsgruppen. Die Gruppen, welche eine MRT erhalten hatten, bestanden für die 3 Gy-Dosis aus elf und für die 5 Gy-Dosis aus neun Koloniebildungstests. Die Gruppengrößen entsprachen einer durchschnittlichen Anzahl von 1,6 CFA pro eingeschlossener Zelllinie (Min. = 1; Max. = 3). Diese lag somit unterhalb des ursprünglich geplanten Umfangs von drei Koloniebildungstests pro in die Analyse aufgenommenen Zelllinie. Die jeweiligen Gruppengrößen sind in der Tabelle 4.3 zusammengefasst.

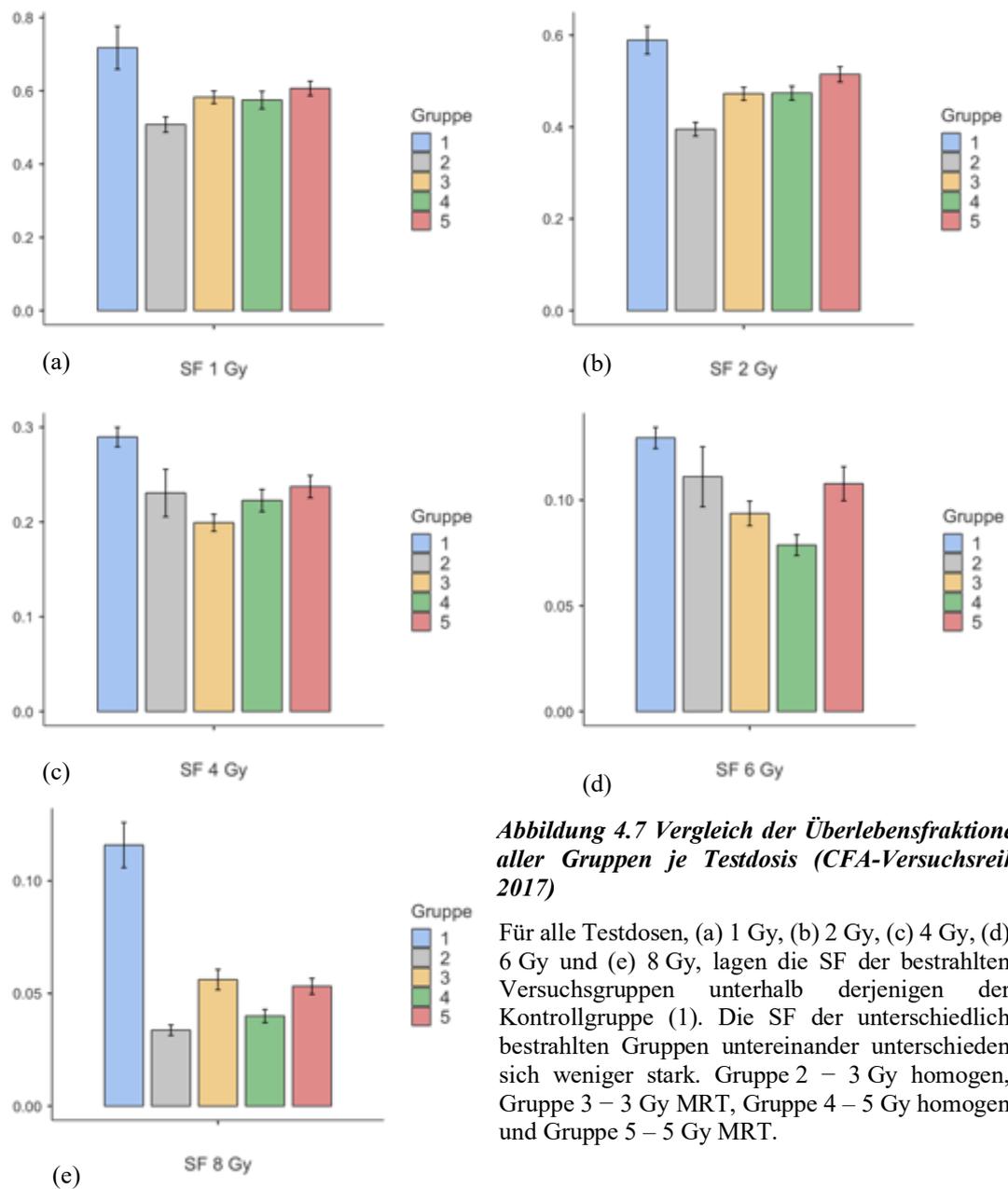


Abbildung 4.7 Vergleich der Überlebensfraktionen aller Gruppen je Testdosis (CFA-Versuchsreihe 2017)

Für alle Testdosen, (a) 1 Gy, (b) 2 Gy, (c) 4 Gy, (d) 6 Gy und (e) 8 Gy, lagen die SF der bestrahlten Versuchsgruppen unterhalb derjenigen der Kontrollgruppe (1). Die SF der unterschiedlich bestrahlten Gruppen untereinander unterschieden sich weniger stark. Gruppe 2 – 3 Gy homogen, Gruppe 3 – 3 Gy MRT, Gruppe 4 – 5 Gy homogen und Gruppe 5 – 5 Gy MRT.

Für die Kontrollgruppe nahm die Überlebensfraktion nach einer Bestrahlung mit 1 Gy auf 0,72 ($SD = 0,20$) ab und sank dann, mit Erhöhung der Dosis, auf 0,59 ($SD = 0,10$) für eine Testdosis von 2 Gy, 0,29 ($SD = 0,04$) für 4 Gy, 0,13 ($SD = 0,02$) für 6 Gy und 0,12 ($SD = 0,04$) für eine Dosis von 8 Gy. Die Überlebensfraktionen aller zuvor bestrahlten Versuchsgruppen lagen, unabhängig von Dosis und Bestrahlungsart, für alle Testdosen jeweils bis zu 20 Prozentpunkte unterhalb denjenigen der Kontrollgruppe. Die Unterschiede innerhalb der SF zwischen den bestrahlten Tumorzelllinien fielen geringer aus. Ein Vergleich der Überlebensfraktionen ist für jede Dosis in der Abbildung 4.7 gezeigt. Bei einer Testdosis von 1 Gy wies die zuvor mit 3 Gy homogen bestrahlte Gruppe eine SF von 0,51 ($SD = 0,18$) auf, sowohl die zuvor mittels MRT mit 3 Gy behandelte Gruppe als auch die homogen mittels 5 Gy bestrahlte Gruppe eine SF von

Tabelle 4.4 Teststatistiken der einfaktoriellen Varianzanalysen bezüglich der unterschiedlichen Überlebensfraktionen in der Versuchsreihe 2017

| Dosis | Teststatistik | p-Wert |
|-------|--------------------|-----------|
| 1 Gy | $F(4,391) = 4.31$ | .002** |
| 2 Gy | $F(4,74.9) = 11.7$ | < .001*** |
| 4 Gy | $\chi^2(4) = 19.4$ | < .001*** |
| 6 Gy | $\chi^2(4) = 13.2$ | .01* |
| 8 Gy | $\chi^2(4) = 40.4$ | < .001*** |

Anmerkung: Für den Vergleich der SF bei einer Dosis von 1 Gy wurde eine ANOVA nach Fisher, für denjenigen bei einer Dosis von 2 Gy eine ANOVA nach Welch durchgeführt. Die Testung auf statistische Signifikanz erfolgte bei allen anderen Dosen durch eine einfaktorielle Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis.

0,58 (beide $SD = 0,20$) und die mittels MRT mit 5 Gy behandelte Gruppe eine SF von 0,61 ($SD = 0,21$). Nach einer Applikation von 2 Gy fielen die Überlebensfraktionen jeweils ab, auf 0,40 ($SD = 0,13$) für die homogen mit 3 Gy bestrahlten Zellen, auf jeweils 0,47 für die Zellen, welche eine MRT mit 3 Gy erhalten hatten ($SD = 0,16$) und für die homogen mit 5 Gy bestrahlten Zellen ($SD = 0,13$) sowie auf 0,52 ($SD = 0,17$) für diejenigen Zellen, welche eine MRT mit 5 Gy erhalten hatten. Eine Dosis von 4 Gy führte für die 3 Gy homogen-Gruppe zu einer SF von 0,23 ($SD = 0,21$), für die 3 Gy MRT-Gruppe zu einer SF von 0,20 ($SD = 0,10$), für die 5 Gy homogen-Gruppe zu einer SF von 0,22 ($SD = 0,01$) und für die 5 Gy MRT-Gruppe zu einer SF von 0,24 ($SD = 0,12$). Sie sank bei einer Testdosis von 6 Gy ab auf jeweils 0,11 für sowohl mit 3 Gy homogen bestrahlte Zellen ($SD = 0,12$) als auch für mit 5 Gy räumlich

fraktioniert bestrahlte Zellen ($SD = 0,08$), sowie auf 0,09 ($SD = 0,07$) für mit 3 Gy räumlich fraktioniert bestrahlte Zellen und auf 0,08 ($SD = 0,04$) für diejenigen Zellen, die homogen mit 5 Gy bestrahlt worden waren. Bei einer Testdosis von 8 Gy lag die SF für alle bestrahlten Gruppen unter 0,1. Für die Gruppe der mit 3 Gy homogen bestrahlten Zellen betrug sie 0,03 ($SD = 0,02$), für die mit 5 Gy homogen bestrahlten 0,04 ($SD = 0,03$), für die 5 Gy MRT-Gruppe 0,05 ($SD = 0,04$) und für die 5 Gy MRT-Gruppe 0,06 ($SD = 0,05$).

Tabelle 4.5 Übersicht über die statistisch signifikanten Ergebnisse der Post-hoc-Analysen bezüglich der Unterschiede der SF zwischen den Versuchsgruppen (CFA-Versuchsreihe 2017)

| Dosis | Gruppenvergleich | p-Wert |
|-------|------------------|----------|
| 1 Gy | 1 - 2 | .031* |
| | 2 - 5 | .007** |
| 2 Gy | 1 - 2 | <.001*** |
| | 1 - 3 | .021* |
| | 1 - 4 | .023* |
| | 2 - 3 | .002** |
| | 2 - 4 | .003** |
| | 2 - 5 | <.001*** |
| 4 Gy | 1 - 2 | .003** |
| | 1 - 3 | .009** |
| | 1 - 4 | .012* |
| 6 Gy | 1 - 2 | .004** |
| | 1 - 3 | .017* |
| | 1 - 4 | <.001*** |
| 8 Gy | 1 - 2 | <.001*** |
| | 1 - 3 | <.001*** |
| | 1 - 4 | <.001*** |
| | 1 - 5 | <.001*** |
| | 2 - 3 | .017* |
| | 2 - 5 | .001*** |

Anmerkung: Für die Testdosen 1 Gy und 2 Gy wurden Post hoc Analysen nach Games-Howell durchgeführt, für alle anderen Dosen paarweise Vergleiche nach Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

Hierbei zeigten dosisspezifisch durchgeführte einfaktorielle Varianzanalysen jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen der SF der Kontrollgruppe und denjenigen der bestrahlten Versuchsgruppen für alle Testdosen. Die Tabelle 4.4 zeigt einen Überblick über die

Testergebnisse. Bei einer Dosis von 1 Gy zeigte sich in einer Post-hoc-Analyse nach Games-Howell lediglich ein signifikantes Ergebnis für den Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den mit 3 Gy homogen bestrahlten Zellen ($p = .031$). Nach einer Dosisapplikation von sowohl 2 Gy, 4 Gy als auch 6 Gy konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der SF der Kontrollgruppe und denjenigen beider mit 3 Gy bestrahlter Gruppen sowie derjenigen der mit 5 Gy homogen bestrahlten Gruppe gezeigt werden. Die Überlebensfraktionen aller bestrahlter Versuchsgruppen lagen nach einer Testdosis von 8 Gy signifikant unter derjenigen der Kontrollgruppe. Zusätzliche signifikante Unterschiede fanden sich sowohl bei einer Dosis von 1 Gy als auch bei den Testdosen 2 Gy und 8 Gy. Hier lag die SF der 5 Gy MRT-Gruppe signifikant höher als diejenige, der homogen mit 3 Gy bestrahlten Tumorzellen (1 Gy: $p = .007$; 2 Gy: $p < .001$; 8 Gy: $W = 5.417$; $p = .001$). Auch die Überlebensfraktionen der 3 Gy MRT-Gruppe lagen für die Dosen 2 Gy und 8 Gy signifikant höher als diejenigen der Zellen, die mit 3 Gy homogen bestrahlt worden waren (2 Gy: $p = .002$; 8 Gy: $W = 4.363$; $p = .017$). Ein weiterer statistisch signifikanter Unterschied fand sich zwischen den Überlebensfraktionen beider homogen bestrahlter Gruppen nach einer Testdosis von 2 Gy ($p = .003$). Auch in diesem Fall war die SF der mit 5 Gy bestrahlten Tumorzellen signifikant höher als diejenige der Zellen, welche mit 3 Gy bestrahlt worden waren. Die Tabelle 4.5 fasst die signifikanten Ergebnisse der Post-hoc-Analysen für alle Testdosen zusammen.

Zusätzlich zur dosisspezifischen Betrachtung der mittleren Überlebensfraktionen aller Versuchsgruppen wurde das dosisabhängige Zellüberleben durch gruppenspezifische Überlebenskurven graphisch verdeutlicht. Die Regression der Daten erfolgte nach dem linear-quadratischen Modell (s.h. Kapitel 3.2.2B, Formel 3.11). Für jede Versuchsgruppe sind die Sensibilitätskoeffizienten mit ihren entsprechenden Standardfehlern in der Tabelle 4.6 aufgeführt. Eine gemeinsame Darstellung aller Überlebenskurven findet sich in der Abbildung 4.8. Für die Überlebenskurve der Kontrollgruppe fand sich ein $\alpha = 0,407 /\text{Gy}$ ($SEM = 0,056$) sowie ein $\beta = -0,015 /\text{Gy}^2$ ($SEM = 0,007$) mit einem Streuparameter von 1,075. In den homogen bestrahlten Gruppen wurde für die mit 3 Gy bestrahlten Zellen ein $\alpha = 0,270 /\text{Gy}$ ($SEM = 0,102$) und ein $\beta = 0,011 /\text{Gy}^2$ ($SEM = 0,012$), sowie für die mit 5 Gy bestrahlten Zellen ein $\alpha = 0,351 /\text{Gy}$ ($SEM = 0,062$) und ein $\beta = 0,009 /\text{Gy}^2$ ($SEM = 0,008$) errechnet, mit Streuparametern von jeweils 5,307 beziehungsweise 2,605. Die Überlebenskurve der Gruppe, welche zuvor eine MRT mit 3 Gy erhalten hatte, zeigte ein $\alpha = 0,440 /\text{Gy}$ ($SEM = 0,054$) und ein $\beta = -0,011 /\text{Gy}^2$ ($SEM = 0,007$), wobei der Streuparameter bei 2,659 lag. Für die 5 Gy MRT-Gruppe errechneten sich ein $\alpha = 0,328 /\text{Gy}$ ($SEM = 0,051$) und ein $\beta = 0,003 /\text{Gy}^2$ ($SEM = 0,006$) sowie ein Streuparameter von 3,254.

Mit Ausnahme der Gruppe, welche homogen mit 3 Gy bestrahlt worden war, unterschieden sich die Überlebenskurven aller bestrahlten Versuchsgruppen in den anschließend durchgeführten paarweisen Vergleichen mittels ANOVA F-Test statistisch signifikant von derjenigen der Kontrolle (3 Gy homogen: $p > .05$; 3 Gy MRT: $F(61,2) = 3.606$; $p = .033$; 5 Gy homogen: $F(36,2) = 14.858$; $p < .001$; 5 Gy MRT: $F(51,2) = 4.436$; $p = .017$). Allerdings näherte sich auch das Ergebnis für die 3 Gy homogen-Gruppe mit einem p-Wert von .068 einer statistischen Signifikanz an.

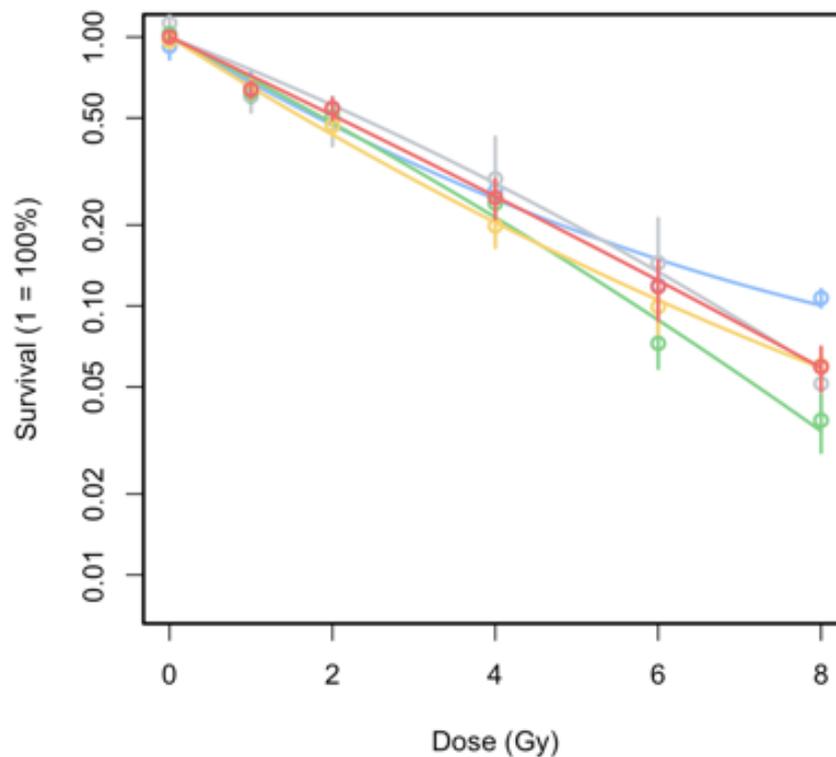


Abbildung 4.8 Dosisabhängige Überlebenskurven aller Gruppen im Vergleich (CFA-Versuchsreihe 2017)

Die blaue Kurve zeigt die Referenzkurve der Kontrollgruppe. Die homogen mit 3 Gy bestrahlte Gruppe ist in grau dargestellt und die homogen mit 5 Gy bestrahlte Gruppe in grün. Die gelbe Kurve bildet das dosisabhängige Überleben der 3 Gy MRT-Gruppe ab und die rote Kurve zeigt dieses für die mit 5 Gy MRT behandelte Gruppe. Die Regression erfolgte nach dem linear-quadratischen Modell mit der Formel $S(D) = \exp(-(\alpha D + \beta D^2))$. Mit Ausnahme der Gruppe, welche homogen mit 3 Gy bestrahlt worden war, unterschieden sich die Kurven der bestrahlten Gruppen in einem ANOVA F-Test jeweils signifikant von der Referenzkurve der Kontrolle.

Zusammenfassung

Mit Ausnahme der 5 Gy MRT-Gruppe, wiesen alle Versuchsgruppen eine ähnliche Ausplattierungseffizienz von etwa 6 – 8 % auf. Die PE der Zellen, welche eine MRT mit 5 Gy erhalten hatten, war mit fast 11 % signifikant höher. Die Varianz der Ausplattierungseffizienzen der einzelnen Zelllinien innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen war in den meisten Fällen sehr hoch. In die Analyse des Zellüberlebens konnten letztendlich 33 Koloniebildungstests eingeschlossen werden. Die Überlebenskurven und Sensibilitätskoeffizienten beider mittels MRT behandelter Gruppen, sowie der Zellen, welche mit 5 Gy homogen bestrahlt worden waren, unterschieden sich signifikant von derjenigen der Kontrollgruppe. Auch die Kurve der mit 3 Gy homogen bestrahlten Zellen näherte sich mit einem $p = .068$ einem statistisch signifikanten Ergebnis an. Dies passt zu den dosisspezifisch durchgeführten Vergleichen der Überlebensfraktionen. Diese lagen für alle bestrahlten Gruppen ab einer Dosis von 2 Gy signifikant unterhalb denjenigen der Kontrollgruppe. Für die 5 Gy MRT-Gruppe war dieser Unterschied allerdings erst für die 8 Gy Testdosis signifikant.

Tabelle 4.6 Sensibilitätskoeffizienten α und β für alle Versuchsgruppen (CFA-Versuchsreihe 2017)

| Gruppe | Koeffizient | SEM |
|--------------|-------------------|-------|
| Kontrolle | $\alpha : 0,407$ | 0,056 |
| | $\beta : - 0,015$ | 0,007 |
| 3 Gy homogen | $\alpha : 0,270$ | 0,102 |
| | $\beta : 0,011$ | 0,012 |
| 3 Gy MRT | $\alpha : 0,440$ | 0,054 |
| | $\beta : - 0,011$ | 0,007 |
| 5 Gy homogen | $\alpha : 0,351$ | 0,062 |
| | $\beta : 0,009$ | 0,008 |
| 5 Gy MRT | $\alpha : 0,328$ | 0,051 |
| | $\beta : 0,003$ | 0,006 |

4.2.2 CFA-Versuchsreihe 2018

Ausplattierungseffizienz

Für die zweite CFA-Versuchsreihe konnten zur Berechnung der PE für die Kontrollgruppe vier Koloniebildungstests eingeschlossen werden. Für die homogen bestrahlten Gruppen waren es für die Dosis von 3 Gy acht und für die 5 Gy-Dosis neun CFA. Die PE der 3 Gy MRT-Gruppe wurde aus 13 Koloniebildungstests bestimmt und die der 5 Gy MRT-Gruppe aus sechs. Für alle Versuchsgruppen lag die berechnete Ausplattierungseffizienz zwischen 6 % und 11 %. Dabei

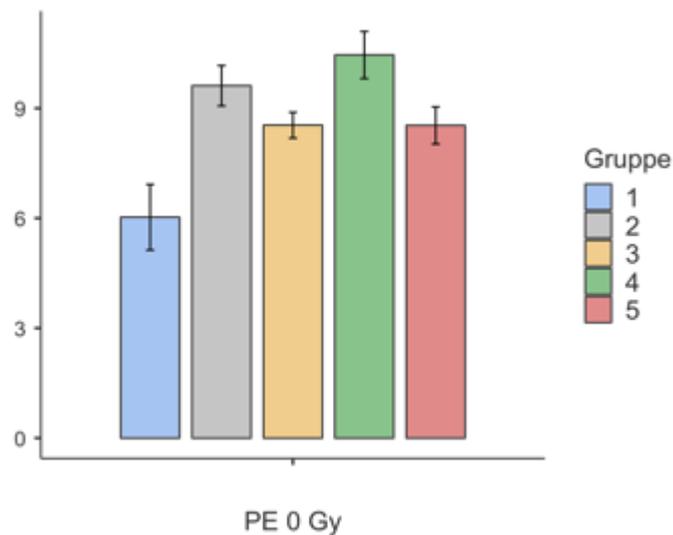


Abbildung 4.9 Mittlere Ausplattierungseffizienzen aller Gruppen in der CFA-Versuchsreihe 2018

Innerhalb der 2018 durchgeführten CFA zeigte die Kontrollgruppe (1) mit 6,03 % die niedrigste Ausplattierungseffizienz aller Versuchsgruppen. Alle zuvor bestrahlten Gruppen wiesen höhere PE auf, welche sich untereinander jedoch nicht statistisch signifikant unterschieden. Für die mit 3 Gy homogen bestrahlten Zellen (2) lag sie bei 9,62 %, für die 3 Gy MRT-Gruppe (3) bei 8,54 %, für die mit 5 Gy homogen bestrahlten Zellen (4) bei 10,45 % und für die 5 Gy MRT-Gruppe bei 8,53 %.

lagen die PE aller zuvor bestrahlten Gruppen bis zu 4,5 Prozentpunkte über derjenigen der Kontrolle. Diese zeigte eine PE von 6,03 % ($SD = 6,22$). Beide Versuchsgruppen, welche mittels MRT behandelt worden waren, wiesen mit 8,54 % ($SD = 4,40$) für die mit 3 Gy bestrahlten Zellen und 8,53 % ($SD = 4,30$) für diejenigen, die mit 5 Gy bestrahlt worden waren, eine sehr ähnliche PE auf. Die PE der mit 3 Gy homogen bestrahlten FaDu-Zellen lag bei 9,62 % ($SD = 5,40$) und diejenige der Zellen, welche eine homogene Bestrahlung mit 5 Gy erhalten hatten, bei 10,45 % ($SD = 6,68$). Die Abbildung 4.9 stellt die gruppenspezifischen mittleren Ausplattierungseffizienzen vergleichend gegenüber. Zusätzlich ist die Streuung der

Werte der PE jeder einzelnen Zelllinie für alle Gruppen in der Abbildung 4.10 dokumentiert. Diese war innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen teilweise sehr ausgeprägt. Die Kontrollgruppe setzte sich aus drei Zelllinien zusammen, von denen zwei eine eher niedrige PE von 3,71 % und 5,88 % aufwiesen, wohingegen für die dritte eine deutlich höhere PE von 10,81 % beobachtet werden konnte. Ähnlich hohe Schwankungen wies die 3 Gy MRT-Gruppe

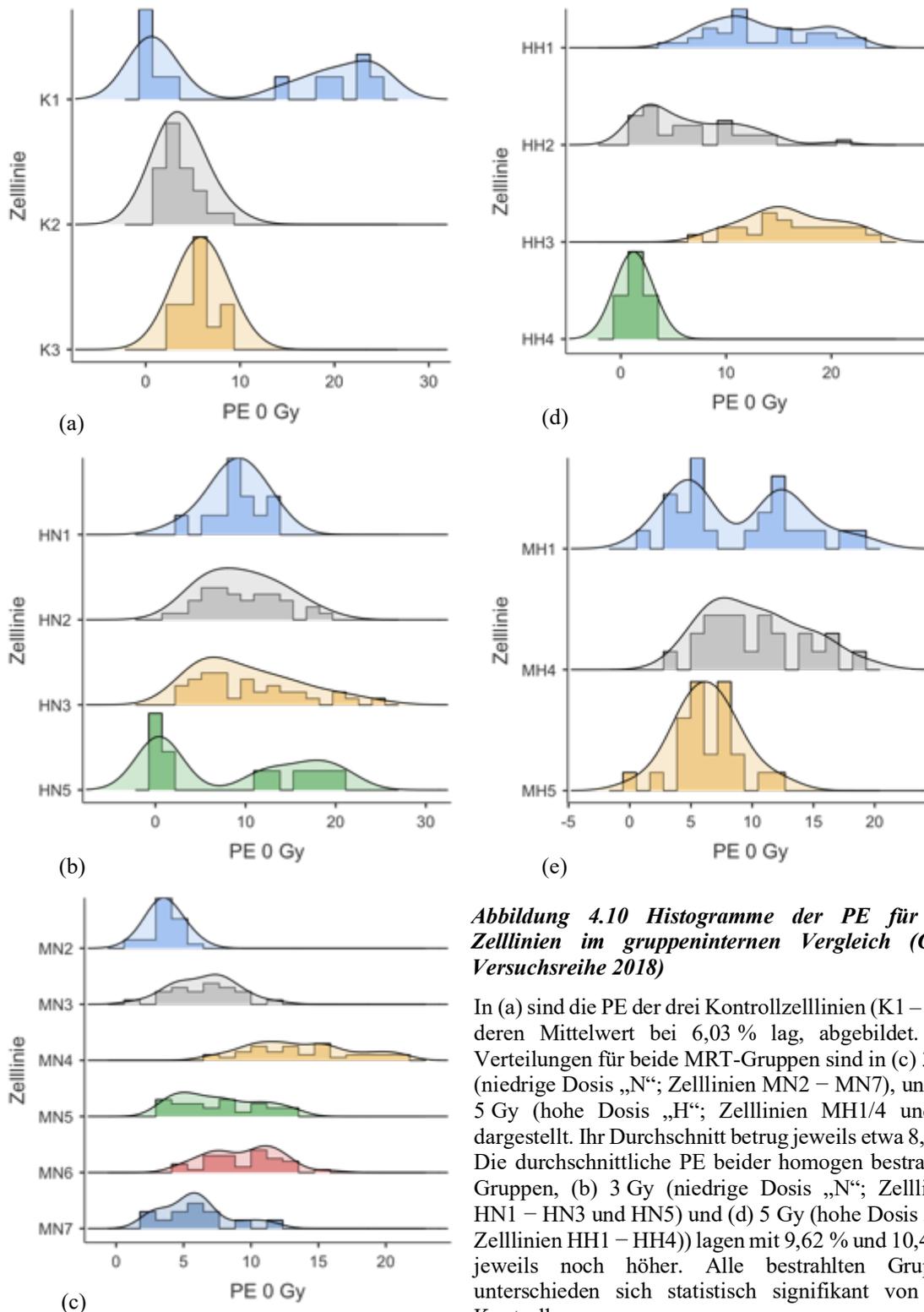


Abbildung 4.10 Histogramme der PE für alle Zelllinien im gruppeninternen Vergleich (CFA-Versuchsreihe 2018)

In (a) sind die PE der drei Kontrollzelllinien (K1 – K3), deren Mittelwert bei 6,03 % lag, abgebildet. Die Verteilungen für beide MRT-Gruppen sind in (c) 3 Gy (niedrige Dosis „N“; Zelllinien MN2 – MN7), und (e) 5 Gy (hohe Dosis „H“; Zelllinien MH1/4 und 5) dargestellt. Ihr Durchschnitt betrug jeweils etwa 8,5 %. Die durchschnittliche PE beider homogen bestrahlter Gruppen, (b) 3 Gy (niedrige Dosis „N“; Zelllinien HN1 – HN3 und HN5) und (d) 5 Gy (hohe Dosis „H“; Zelllinien HH1 – HH4)) lagen mit 9,62 % und 10,45 % jeweils noch höher. Alle bestrahlten Gruppen unterschieden sich statistisch signifikant von den Kontrollen.

auf. Innerhalb dieser gab es vier Zelllinien, deren PE mit jeweils 3,62 %, 5,90 %, 6,56 % und 7,58 % unter dem Gruppendurchschnitt lagen sowie zwei, die eine höhere PE mit jeweils 9,46 % und 13,74 % aufwiesen. Die größte Streuung der Daten konnte für die mit 5 Gy homogen bestrahlten Zellen beobachtet werden. Hier lagen zwei Zelllinien mit einer PE von jeweils 1,25 % und 6,67 % deutlich unterhalb des gruppenspezifischen Mittelwertes, während weitere zwei diesen mit jeweils 13,65 % und 16,07 % überschritten. Sowohl für die Zellen, welche homogen mit 3 Gy bestrahlt worden waren, als auch für diejenigen der 5 Gy MRT-Gruppe zeigten die einzelnen Ausplattierungseffizienzen eine homogenere Verteilung. Für die räumlich fraktioniert behandelten Zellen konnten PE von 6,38 %, 8,94 % und 10,28 % beobachtet werden. Die einzelnen PE der zuvor homogen mit 3 Gy bestrahlten Zellen lagen noch näher beieinander. Sie betrug 8,44 %, 8,94 %, 9,65 % und 10,20 %.

Für die gesammelten Daten konnten weder eine Normverteilung noch homogene Varianzen angenommen werden (Shapiro-Wilk: $W = 0.97$; $p < .001$; Levene: $F(4/475) = 7.63$; $p < .001$). In einer einfaktoriellem Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis ($\chi^2(4) = 30,03$; $p < .001$) und anschließend durchgeführten paarweisen Post-hoc-Vergleichen zeigten sich die Ausplattierungseffizienzen aller bestrahlten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe als statistisch signifikant erhöht (3 Gy homogen: $W = 6.50$; $p < .001$; 3 Gy MRT: $W = 6.65$; $p < .001$; 5 Gy homogen: $W = 5.48$; $p = .001$; 5 Gy MRT: $W = 5.99$; $p < .001$). Untereinander unterschieden sich die PE der zuvor bestrahlten Versuchsgruppen nicht signifikant (jeweils $p > .05$).

Überlebensfraktion

Aus der Analyse der dosisabhängigen Überlebensfraktionen mussten innerhalb der 2018 erhobenen Daten weitere 14 CFA ausgeschlossen werden, deren SF nicht wie normalerweise eine mit steigender Testdosis kontinuierliche Abnahme zeigte. Diese Abweichungen mussten aller Wahrscheinlichkeit nach auf Ungenauigkeiten in der Aussaat oder auf äußere Einflüsse während dem Transport zurückgeführt werden, weshalb die Daten nicht berücksichtigt werden konnten. Die finale Stichprobengröße bestand also aus 26 Koloniebildungstests, von denen jeweils zwei zur Kontrollgruppe sowie zur 5 Gy MRT-Gruppe zählten. Die homogen bestrahlten Gruppen bestanden aus vier CFA für die 5 Gy-Dosis und sechs für die 3 Gy-Dosis. Den größten Umfang hatte mit zwölf Koloniebildungstests die 3 Gy MRT-Gruppe. Diese Gruppengrößen entsprachen durchschnittlich 1,5 CFA pro eingeschlossener Zelllinie (Min. = 1; Max. = 3). Sie lagen damit unterhalb des eigentlich geplanten Umfangs von drei

Koloniebildungstests pro in die Analyse aufgenommenen Zelllinie. Die jeweiligen Gruppengrößen sind in der Tabelle 4.7 zusammengefasst.

Tabelle 4.7 Anzahl der Zelllinien und CFA die in die Analyse der Daten aus der Versuchsreihe 2018 eingeschlossen werden konnten

| Gruppe | Plattierungseffizienz | | Überlebensfraktion | |
|--------------|-----------------------|-----|--------------------|-----|
| | Zelllinien | CFA | Zelllinien | CFA |
| Kontrolle | 3 | 4 | 2 | 2 |
| 3 Gy homogen | 4 | 8 | 3 | 6 |
| 3 Gy MRT | 6 | 13 | 6 | 12 |
| 5 Gy homogen | 4 | 9 | 3 | 4 |
| 5 Gy MRT | 3 | 6 | 2 | 2 |

Anmerkung: Aufgrund eines abweichenden Verlaufs der dosisspezifischen SF, der am wahrscheinlichsten auf Ungenauigkeiten während der Aussaat oder auf äußere Einflüsse durch den Transport der Zellen zurück zu führen war, mussten von der Berechnung der mittleren SF der Gruppen weitere CFA ausgeschlossen werden.

Nach der Bestrahlung der CFA mit 1 Gy unterschieden sich die Überlebensfraktionen der verschiedenen Versuchsgruppen nur wenig voneinander. Die Kontrollgruppe zeigte bei dieser niedrigen Dosis eine SF von 0,69 ($SD = 0,48$), während die homogen mit 3 Gy bestrahlten Zellen mit 0,51 ($SD = 0,26$) die niedrigste SF aufwiesen. Die Überlebensfraktionen aller anderen Gruppen lagen bei 0,63 (SD der mit 5 Gy bestrahlten Zellen jeweils 0,18; 3 Gy MRT: $SD = 0,25$). Mit steigender Testdosis fanden sich deutlichere Abweichungen der SF zwischen den Versuchsgruppen. Nach der Bestrahlung mit 2 Gy wies die Kontrollgruppe mit 0,61 ($SD = 0,26$) noch immer die höchste SF auf. Es folgten die 5 Gy MRT-Gruppe mit 0,51 ($SD = 0,17$), die 3 Gy MRT-Gruppe mit 0,45 ($SD = 0,14$), die Gruppe, welche eine homogene Bestrahlung mit 5 Gy erhalten hatte mit 0,43 ($SD = 0,15$), sowie die zuvor homogen mit 3 Gy bestrahlten Zellen, welche mit 0,33 ($SD = 0,15$), wie schon bei der Testdosis von 1 Gy, die niedrigste SF aufwiesen. Auch für die höheren Testdosen blieb deren SF die geringste. Bei 4 Gy sank sie auf 0,12 ($SD = 0,05$), bei 6 Gy auf 0,03 ($SD = 0,02$) und nach einer Applikation von 8 Gy betrug sie nurmehr 0,01 ($SD = 0,01$). Auch für die mit 5 Gy homogen bestrahlte Versuchsgruppe ließen sich vergleichsweise niedrige SF feststellen. Mit steigender Testdosis sank die Überlebensfraktion auf 0,14 ($SD = 0,06$) bei 4 Gy, auf 0,04 ($SD = 0,02$) bei 6 Gy, sowie auf ebenfalls nurmehr 0,01 ($SD = 0,01$) nach einer Applikation von 8 Gy. Die höchsten

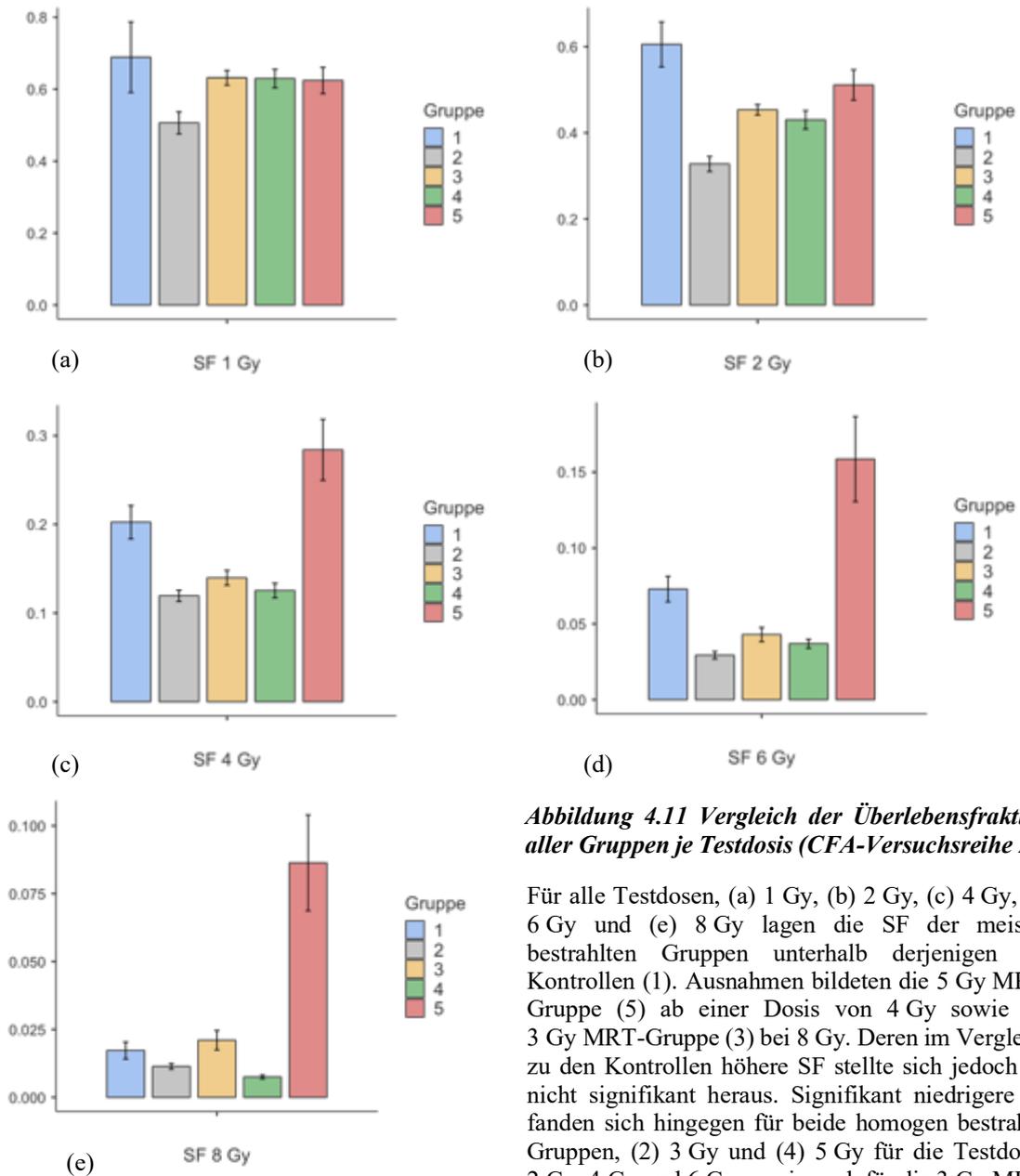


Abbildung 4.11 Vergleich der Überlebensfraktionen aller Gruppen je Testdosis (CFA-Versuchsreihe 2018)

Für alle Testdosen, (a) 1 Gy, (b) 2 Gy, (c) 4 Gy, (d) 6 Gy und (e) 8 Gy lagen die SF der meisten bestrahlten Gruppen unterhalb derjenigen der Kontrollen (1). Ausnahmen bildeten die 5 Gy MRT-Gruppe (5) ab einer Dosis von 4 Gy sowie die 3 Gy MRT-Gruppe (3) bei 8 Gy. Deren im Vergleich zu den Kontrollen höhere SF stellte sich jedoch als nicht signifikant heraus. Signifikant niedrigere SF fanden sich hingegen für beide homogen bestrahlte Gruppen, (2) 3 Gy und (4) 5 Gy für die Testdosen 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy, sowie auch für die 3 Gy MRT-Gruppe für die Dosen 4 Gy und 6 Gy.

Überlebensfraktionen wies ab einer Testdosis von 4 Gy die 5 Gy MRT-Gruppe auf. Nach einer Bestrahlung mit 4 Gy betrug sie noch 0,28 ($SD = 0,17$), nach 6 Gy noch 0,16 ($SD = 0,14$) und nach 8 Gy 0,09 ($SD = 0,09$). Sowohl die SF der Gruppe, welche eine MRT mit 3 Gy erhalten hatte, als auch diejenigen der Kontrolle, lagen zwischen den zuvor geschilderten Werten. Die Kontrollgruppe zeigte mit 0,20 ($SD = 0,09$) nach 4 Gy, 0,07 ($SD = 0,04$) nach 6 Gy sowie 0,02 ($SD = 0,02$) nach 8 Gy die zweithöchsten Überlebensfraktionen. Wobei diejenigen der 3 Gy MRT-Gruppe mit 0,14 ($SD = 0,10$) nach 4 Gy, 0,04 ($SD = 0,07$) nach 6 Gy und 0,02 ($SD = 0,04$) nach einer Dosisapplikation von 8 Gy knapp darunter lagen. In der Abbildung 4.11 sind die gruppenspezifischen Überlebensfraktionen für jede Testdosis graphisch dargestellt. Sie

verdeutlicht den im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen langsameren Abfall der SF der 5 Gy MRT-Gruppe.

In für jede Testdosis durchgeführten einfaktoriellen Varianzanalysen und anschließenden Post-hoc-Tests zeigte sich, dass die SF beider homogen bestrahlter Gruppen bei den Testdosen von 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy signifikant von derjenigen der Kontrollgruppe abwichen. Für die 8 Gy Dosis war dieser Unterschied nicht mehr signifikant. Gleiches traf für die Testdosen von 4 Gy und 6 Gy auch auf die Überlebensfraktionen der 3 Gy MRT-Gruppe zu. Weitere signifikante Unterschieden fanden sich für alle Testdosen ≥ 2 Gy zwischen der 5 Gy MRT-Gruppe und den anderen bestrahlten Versuchsgruppen, nicht jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den Tabellen 4.8 und 4.9 sind diese Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 4.8 Teststatistiken der einfaktoriellen Varianzanalysen bezüglich der unterschiedlichen Überlebensfraktionen der CFA-Versuchsreihe 2018

| Dosis | Teststatistik | p-Wert |
|-------|----------------------|-----------|
| 1 Gy | $F(4,81.22) = 3.40$ | .013* |
| 2 Gy | $F(4,76.66) = 13.24$ | < .001*** |
| 4 Gy | $F(4,78.63) = 9.53$ | < .001*** |
| 6 Gy | $\chi^2(4) = 40,46$ | < .001*** |
| 8 Gy | $\chi^2(4) = 16.84$ | .002** |

Anmerkung: Für den Vergleich der SF bei den Testdosen 1 Gy, 2 Gy und 4 Gy wurde eine ANOVA nach Welch durchgeführt. Die Testung auf statistische Signifikanz erfolgte bei den höheren Dosen durch eine einfaktorielle Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis.

Ergänzend zur dosisspezifischen Betrachtung der Überlebensfraktionen wurde das Zellüberleben in Abhängigkeit von der Testdosis für alle Gruppen graphisch in Form von Überlebenskurven verdeutlicht. Diese wurden durch die Regression der gesammelten Daten nach dem linear-quadratischen Modell (s.h. Kapitel 3.2.2B, Formel 3.11) für jede Gruppe erstellt. Die Abbildung 4.12 zeigt alle Überlebenskurven im Vergleich. Zusätzlich hierzu sind die errechneten Sensibilitätskoeffizienten aller Gruppen in der Tabelle 4.10 einander gegenübergestellt. Für die Überlebenskurve der Kontrolle konnten ein $\alpha = 0,187$ /Gy ($SEM = 0,099$) sowie ein $\beta = 0,045$ /Gy² ($SEM = 0,014$), mit einem Streuparameter von 1,500 berechnet werden. In den homogen bestrahlten Gruppen fand sich für die niedrigere Dosis von 3 Gy ein $\alpha = 0,519$ /Gy ($SEM = 0,055$) sowie ein $\beta = 0,006$ /Gy² ($SEM = 0,008$), mit einem

Streuparameter von 1,341, und für die höhere Dosis von 5 Gy ein $\alpha = 0,418$ /Gy ($SEM = 0,040$) sowie ein $\beta = 0,024$ /Gy² ($SEM = 0,006$), mit einem Streuparameter von 0,684. Innerhalb der mittels MRT behandelten Gruppen ließen sich deutlich höhere Streuparameter feststellen. Für die 3 Gy Dosis lag dieser bei 6,110, bei einem $\alpha = 0,464$ /Gy ($SEM = 0,080$) sowie einem $\beta = 0,003$ /Gy² ($SEM = 0,011$). Für die 5 Gy Dosis betrug er 11,960, bei einem $\alpha = 0,367$ /Gy ($SEM = 0,216$) und ebenfalls einem $\beta = 0,003$ /Gy² ($SEM = 0,026$). In Hinblick auf das dosisabhängige Zellüberleben unterschieden sich beide homogen bestrahlten Gruppen in individuell durchgeführten ANOVA F-Tests signifikant von der Kontrolle (3 Gy homogen: $F(36,2) = 5.227$; $p = .010$; 5 Gy homogen: $F(26,2) = 6.054$; $p = .007$).

Tabelle 4.9 Übersicht über die statistisch signifikanten Ergebnisse der Post-hoc-Analysen bezüglich der Unterschiede der Überlebensfraktionen zwischen den Versuchsgruppen (CFA-Versuchsreihe 2018)

| Dosis | Gruppenvergleich | p-Wert |
|-------|------------------|----------|
| 2 Gy | 1 - 2 | <.001*** |
| | 1 - 4 | .003** |
| | 2 - 3 | <.001*** |
| | 2 - 4 | .003** |
| | 2 - 5 | <.001*** |
| 4 Gy | 1 - 2 | .002** |
| | 1 - 3 | .034* |
| | 1 - 4 | .006** |
| | 2 - 5 | <.001*** |
| | 3 - 5 | .003** |
| | 4 - 5 | .001*** |
| 6 Gy | 1 - 2 | <.001*** |
| | 1 - 3 | <.001*** |
| | 1 - 4 | .003** |
| | 2 - 5 | <.001*** |
| | 3 - 5 | <.001*** |
| | 4 - 5 | .015* |
| 8 Gy | 1 - 4 | .052 |
| | 3 - 5 | .043* |
| | 4 - 5 | .051 |

Anmerkung: Für die Testdosen 2 Gy und 4 Gy wurden Post-hoc-Analysen nach Games-Howell durchgeführt, für die anderen Dosen paarweise Vergleiche nach Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

Für die Überlebenskurven beider mittels MRT behandelter Versuchsgruppen konnte hingegen keine signifikante Abweichung von derjenigen der Kontrolle festgestellt werden (jeweils $p > .05$).

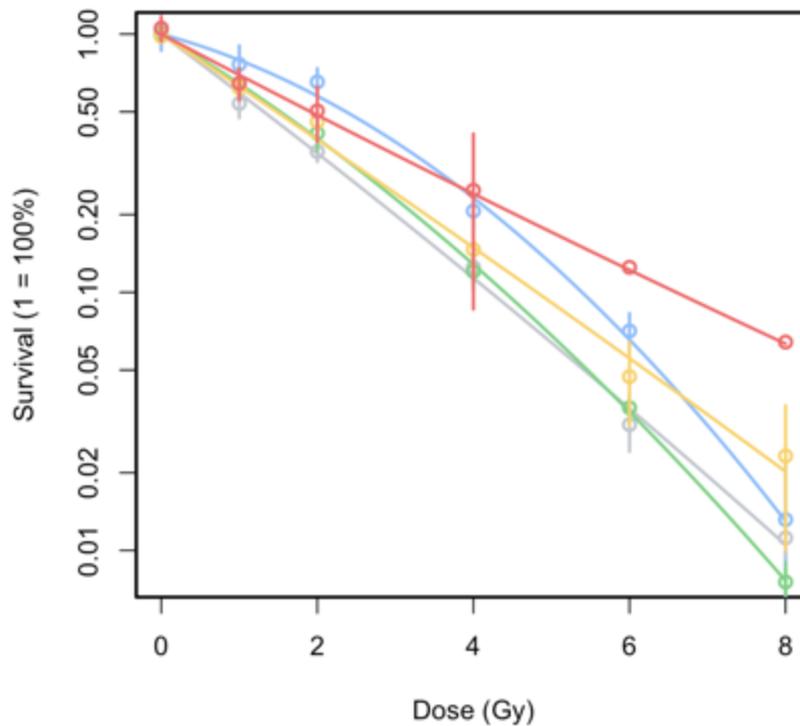


Abbildung 4.12 Dosisabhängige Überlebenskurven aller Gruppen im Vergleich (CFA-Versuchsreihe 2018)

Die blaue Kurve zeigt die Referenzkurve der Kontrollgruppe. Die homogen mit 3 Gy bestrahlte Gruppe ist in grau dargestellt und die homogen mit 5 Gy bestrahlte Gruppe in grün. Die gelbe Kurve bildet das dosisabhängige Überleben der Zellen der 3 Gy MRT-Gruppe ab und die rote Kurve zeigt dieses für die mit 5 Gy MRT behandelten Zellen. Die Regression erfolgte nach dem linear-quadratischen Modell mit der Formel $S(D) = \exp(-(\alpha D + \beta D^2))$. Die Kurven beider homogen bestrahlter Gruppen unterschieden sich in einem ANOVA F-Test jeweils signifikant von der Referenzkurve der Kontrolle.

Zusammenfassung

Alle bestrahlten Versuchsgruppen wiesen mit 8,5 – 10,5 % signifikant höhere Ausplattierungseffizienzen als die Kontrolle auf. Die Varianz der zellinienspezifischen PE war innerhalb der meisten Versuchsgruppen sehr hoch. In die Analyse des Zellüberlebens konnten letztendlich 26 Koloniebildungstests eingeschlossen werden. Die Überlebenskurven und Sensibilitätskoeffizienten beider homogen bestrahlter Versuchsgruppen unterschieden sich signifikant von derjenigen der Kontrollgruppe. Für die mittels MRT behandelten Gruppen

konnte keine signifikante Abweichung beobachtet werden. Allerdings näherte sich der p-Wert für den Vergleich der Überlebenskurven der 5 Gy MRT-Gruppe und der Kontrolle mit $p = .06$ ebenfalls einem statistisch signifikanten Ergebnis an. Dies spiegelt sich auch innerhalb der dosisspezifisch durchgeführten Vergleiche der Überlebensfraktionen wider. Auch hier zeigten sich, zumindest für die Testdosen 4 Gy und 6 Gy, statistisch signifikant niedrigere SF für beide homogen bestrahlten Gruppen sowie für die 3 Gy MRT-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle. Die Überlebensfraktionen der 5 Gy MRT-Gruppe lagen allerdings ab einer Dosis von 4 Gy deutlich oberhalb denjenigen aller anderen Gruppen. Dieser Unterschied zeigte sich jedoch als statistisch nicht signifikant.

Tabelle 4.10 Sensibilitätskoeffizienten α und β für alle Versuchsgruppen (CFA-Versuchsreihe 2018)

| Gruppe | Koeffizient | SEM |
|--------------|------------------|-------|
| Kontrolle | α : 0,187 | 0,099 |
| | β : 0,045 | 0,014 |
| 3 Gy homogen | α : 0,519 | 0,055 |
| | β : 0,006 | 0,008 |
| 3 Gy MRT | α : 0,464 | 0,080 |
| | β : 0,003 | 0,011 |
| 5 Gy homogen | α : 0,418 | 0,040 |
| | β : 0,024 | 0,006 |
| 5 Gy MRT | α : 0,367 | 0,216 |
| | β : 0,003 | 0,026 |

4.2.3 Vergleich beider CFA-Versuchsreihen

Ausplattierungseffizienz

In beiden Versuchsreihen lagen die berechneten Ausplattierungseffizienzen aller Gruppen zwischen 6 % und 11 %. Innerhalb der Koloniebildungstests von 2017 wich nur die 5 Gy MRT-Gruppe in Hinblick auf die PE signifikant von allen anderen Gruppen ab. Diese lag mit 10,59 % sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch im Vergleich zu allen anderen bestrahlten Gruppen statistisch signifikant höher. In der Versuchsreihe von 2018 hingegen lagen die PE aller zuvor bestrahlten Gruppen statistisch signifikant über derjenigen der Kontrolle. Untereinander wiesen

die vorbestrahlten Gruppen in Hinblick auf ihre PE, welche zwischen 8,5 % und 10,5 % lagen, keine deutlichen Unterschiede auf.

Die Streuung der PE-Daten war für beide CFA-Versuchsreihen ähnlich hoch. Innerhalb der Koloniebildungstests von 2017 schwankten sie zwischen etwa 2 % und 14 %, wobei die homogen mit 5 Gy bestrahlte Gruppe die größte Streubreite der zelllinienspezifischen PE aufwies. Für die 5 Gy MRT-Gruppe zeigten sich einerseits die homogensten PE-Daten und andererseits auch die höchste Ausplattierungseffizienz. Auch innerhalb der 2018 durchgeführten CFA schwankte die PE zwischen etwa 1 % und 16 %. Auch hier besaß die Gruppe der homogen mit 5 Gy bestrahlten Zellen die größte Streubreite. Die homogensten PE-Daten stammten 2018 zum einen aus der Gruppe von Zellen, welche mit 3 Gy homogen bestrahlt worden waren und zum anderen, wie auch schon 2017, aus der 5 Gy MRT-Gruppe.

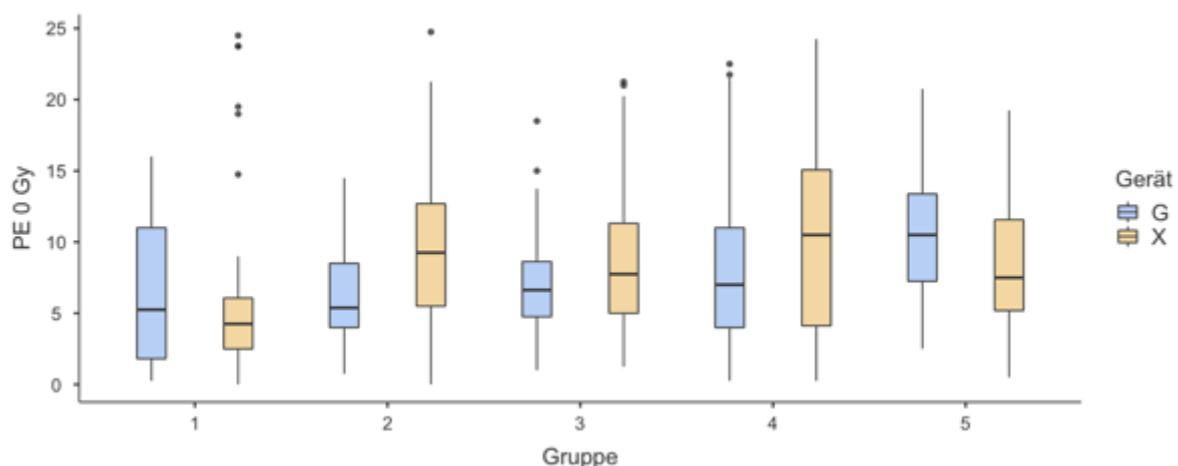


Abbildung 4.13 Vergleich der gruppenspezifischen Ausplattierungseffizienzen beider CFA-Versuchsreihen

Abgebildet sind der gruppenspezifische Median und die Streuung der Daten im Sinne von Interquartilenabstand (IQR) und Ausreißerwerten, welche außerhalb des 1,5-fachen des IQR liegen. Die PE der Kontrollgruppe (1) zeigte einen Median von 5,25 % in der Versuchsreihe von 2017 (*Gulmay* (G) in blau) sowie von 4,25 % innerhalb der Daten von 2018 (*Xstrahl* (X) in gelb). Für die mit 3 Gy homogen bestrahlten Zellen (2) lag die mediane PE bei 5,38 % (G) beziehungsweise 9,25 % (X). Sie betrug 6,63 % (G) bzw. 7,75 % (X) für die 3 Gy MRT-Gruppe (3). In der Gruppe der Tumorzellen, welche homogen mit 5 Gy bestrahlt worden waren (4) lag die mediane PE 2017 bei 7,00 % (G) und 2018 bei 10,50 % (X). Die 5 Gy MRT-Gruppe zeigte eine genau gegenteilige Verteilung der PE mit 10,50 % in der ersten (G) und 7,50 % in der zweiten CFA-Versuchsreihe (X).

Vergleich man die gruppenspezifischen Mittelwerte der PE beider Versuchsreihen miteinander, so überstieg die PE der Koloniebildungstests aus dem Jahr 2018 diejenige der schon 2017 durchgeführten Tests für beide mit 3 Gy bestrahlten Gruppen sowie für die mit 5 Gy homogen bestrahlten Zellen um durchschnittlich 2,45 Prozentpunkte. Innerhalb der 5 Gy MRT-Gruppe zeigte sich ein umgekehrtes Bild, hier wiesen die 2017 durchgeführten CFA eine um

2,42 Prozentpunkte höhere PE auf. In für jede Gruppe durchgeführten Mann-Whitney-U-Tests ergaben sich für diese Unterschiede jeweils statistisch signifikante Ergebnisse (3 Gy homogen: $U(132/96) = 3783$; $p < .001$; 3 Gy MRT: $U(132/156) = 8333$; $p = .005$; 5 Gy homogen: $U(105/108) = 4561$; $p = .014$; 5 Gy MRT: $U(131/72) = 3428$; $p = .001$). Für die Kontrollgruppe zeigten sich, mit 6,50 % im Jahr 2017 und 6,03 % im Jahr 2018, hingegen keine unterschiedlichen Ausplattierungseffizienzen der beiden Teilanalysen (Mann-Whitney-U: $p > .05$). Die Abbildung 4.13 vergleicht die medianen Ausplattierungseffizienzen beider CFA-Versuchsreihen für alle Gruppen.

Überlebensfraktion

In der 2017 durchgeführten CFA-Versuchsreihe zeigten sich für die höheren Testdosen signifikant niedrigere Überlebensfraktionen aller bestrahlter Versuchsgruppen im Vergleich zur

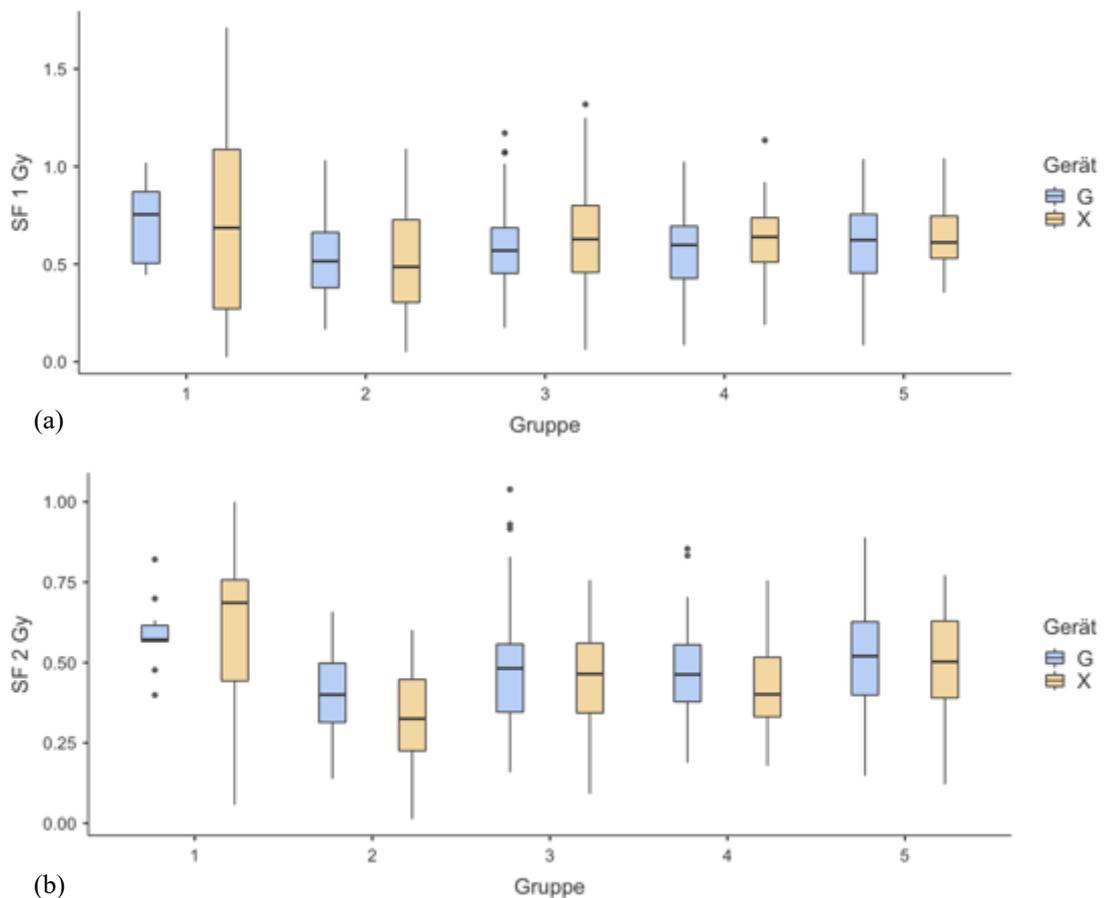


Abbildung 4.14 Gerätespezifischer Vergleich der SF für die mit 1 Gy und 2 Gy bestrahlten Testplatten beider CFA-Versuchsreihen

Nach einer Dosisapplikation von 1 Gy (a) waren die SF aller Versuchsgruppen an beiden Geräten vergleichbar. Bei einer Testdosis von 2 Gy (b) unterschieden sich diese für die Kontrollgruppe (1) und beide mit 5 Gy bestrahlten Gruppen, (4) homogen und (5) MRT, sowie für die 3 Gy MRT-Gruppe (3) ebenfalls nicht. Für die mit 3 Gy homogen bestrahlte Gruppe (2) lag die SF der 2 Gy-Testplatten, welche am *Gulmay* (G) behandelt wurden, jedoch statistisch signifikant über derjenigen, der am *Xstrahl* (X) bestrahlten Platten.

Kontrolle. Untereinander unterschieden sich diese nur unwesentlich. In der Versuchsreihe von 2018 lagen die Überlebensfraktionen beider mit 3 Gy bestrahlten Gruppen, sowie der mit 5 Gy

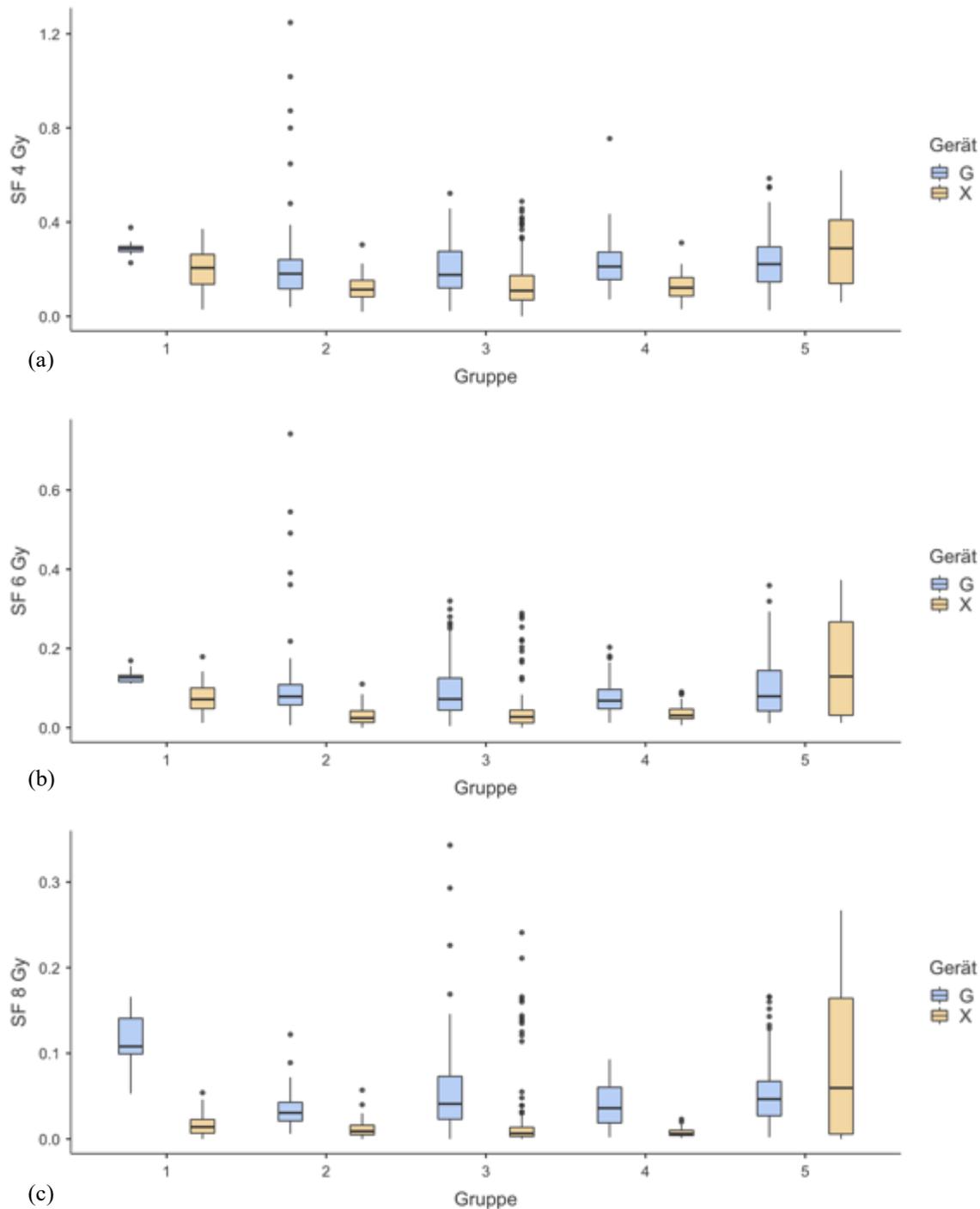


Abbildung 4.15 Gerätespezifischer Vergleich der Überlebensfraktionen der mit 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy bestrahlten Testplatten beider CFA-Versuchsreihen

Für die Testdosen, 4 Gy (a), 6 Gy (b) und 8 Gy (c), lagen sowohl die SF der Kontrollgruppe (1), als auch diejenigen beider mit 3 Gy bestrahlter Gruppen, homogen (2) und MRT (3), sowie die der Zellen, welche eine homogene Bestrahlung mit 5 Gy erhalten hatten (4), in der Versuchsreihe 2017 (G) jeweils signifikant über der SF der 2018 durchgeführten CFA (X). Für die 5 Gy MRT-Gruppe konnte hingegen kein statistisch signifikanter Unterschied der dosisabhängigen SF zwischen beiden Versuchsreihen gefunden werden.

homogen behandelten Gruppe ebenfalls zum Teil statistisch signifikant unterhalb derjenigen der Kontrolle. Dieses Phänomen ließ sich allerdings nur für die Dosen 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy, nicht jedoch für die Testdosis von 8 Gy beobachten. Die 5 Gy MRT-Gruppe zeigte in der zweiten Versuchsreihe überraschenderweise keine signifikante Abweichung von der Kontrolle, schien jedoch einen deutlich verzögerten Abfall der dosisabhängigen Überlebensfraktion aufzuweisen, welche für fast alle Testdosen deutlich oberhalb derjenigen aller anderen Gruppen lag.

Wurden beide Versuchsreihen in Hinblick auf ihre Ergebnisse zur Strahlensensibilität der Zellen verglichen, so schienen beide Bestrahlungsgeräte, das *Gulmay RS225* (damals *Gulmay Medical*) des Klinikums rechts der Isar (G) und das *Xstrahl RS225* am Helmholtz Zentrum München in Neuherberg (X) (beide *Xstrahl Limited*, Camberley, Vereinigtes Königreich), bei den niedrigen applizierten Testdosen, zu ähnlichen Überlebensfraktionen zu führen. Bei steigender Dosis zeigten sich allerdings für alle Versuchsgruppen Unterschiede zwischen den SF aus den beiden Versuchsreihen. Diese waren in fast jedem Fall statistisch signifikant. Eine Ausnahme bildete hierbei die SF der 5 Gy MRT-Gruppe. Für sie ergaben sich in durchgeführten t-Tests keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Überlebensfraktionen der an den verschiedenen Geräten durchgeführten CFA (jeweils $p > .05$). Die SF der am *Gulmay* bestrahlten Koloniebildungstests lag für alle anderen Gruppen ab einer Dosis von 4 Gy

Tabelle 4.11 Überblick über die statistisch signifikanten Unterschiede der Überlebensfraktionen zwischen den CFA welche am *Gulmay* beziehungsweise am *Xstrahl* durchgeführt wurden für ausgewählte Versuchsgruppen

| Dosis | Kontrolle | 3 Gy homogen | 3 Gy MRT | 5 Gy homogen |
|-------|------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|
| 2 Gy | | $t(138.4) = 2.92$ | | |
| | $p > .5$ | $p = .004^{**}$ | $p > .5$ | $p > .5$ |
| 4 Gy | $t(32.7) = 4.08$ | $U(72/72) = 1361.0$ | $U(132/144) = 5838.5$ | $U(72/48) = 602.0$ |
| | $p < .001^{***}$ | $p < .001^{***}$ | $p < .001^{***}$ | $p < .001^{***}$ |
| 6 Gy | $t(33.4) = 5.76$ | $U(72/72) = 455.0$ | $U(131/144) = 3634.5$ | $U(72/48) = 561.0$ |
| | $p < .001^{***}$ | $p < .001^{***}$ | $p < .001^{***}$ | $p < .001^{***}$ |
| 8 Gy | $t(13.1) = 9.39$ | $U(72/72) = 559.0$ | $U(130/144) = 2802.5$ | $U(72/48) = 194.5$ |
| | $p < .001^{***}$ | $p < .001^{***}$ | $p < .001^{***}$ | $p < .001^{***}$ |

statistisch signifikant oberhalb derjenigen der am *Xstrahl* durchgeführten. In beiden Gruppen, welche mit 3 Gy bestrahlt worden waren, zeigte sich bereits ab einer Testdosis von 2 Gy ein signifikanter Unterschied der SF. In den Abbildungen 4.14 und 4.15 sind diese gerätespezifischen Unterschiede für jede Testdosis graphisch verdeutlicht. Außerdem zeigt die Tabelle 4.11 einen Überblick über die statistisch signifikanten Unterschiede der gruppenspezifischen SF beider Versuchsreihen.

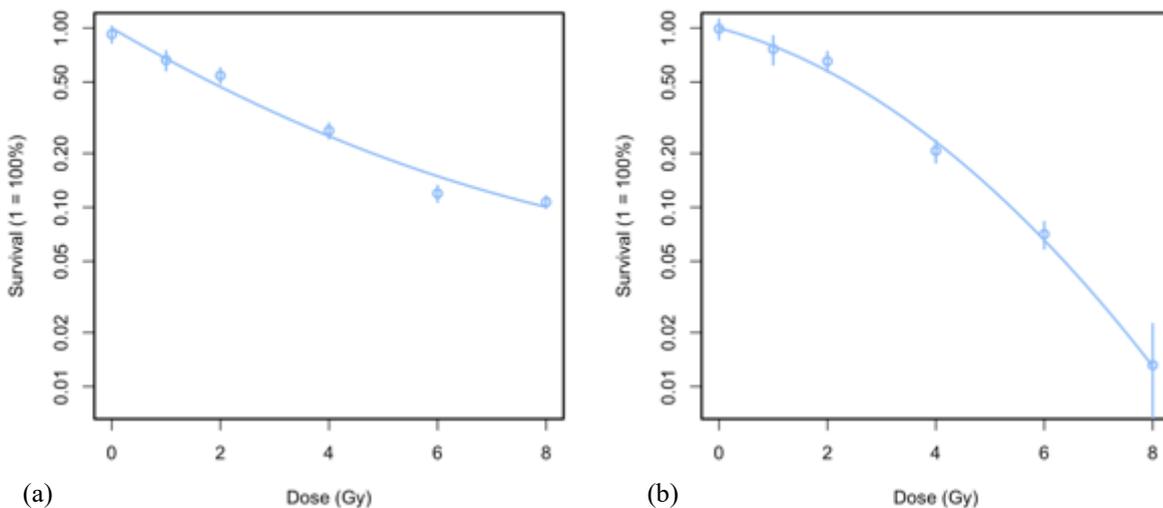


Abbildung 4.16 Gegenüberstellung der Überlebenskurven der Kontrollgruppe aus beiden CFA-Versuchsreihen

In der Versuchsreihe 2017 (a) berechnete sich für die Überlebenskurve der Kontrolle ein $\alpha = 0,407 / \text{Gy}$ und $\beta = -0,015 / \text{Gy}^2$. 2018 (b) fanden sich Sensibilitätskoeffizienten von jeweils $\alpha = 0,187 / \text{Gy}$ und $\beta = 0,045 / \text{Gy}^2$. Der Unterschied ist in einem deutlich gekrümmten Verlauf, mit typischer „Schulter“, der aus den Daten von 2018 berechneten Kurve sichtbar.

Auch in Hinblick auf die Regressionskurven, welche das Zellüberleben jeder Gruppe in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis abbilden, ließen sich zwischen beiden CFA-Versuchsreihen für die meisten Gruppen deutliche Unterschiede feststellen. Diese waren für die beiden mittels MRT behandelten Versuchsgruppen am geringsten. Für die 3 Gy MRT-Gruppe lagen die Sensibilitätskoeffizienten 2017 bei $\alpha = 0,440 / \text{Gy}$ und $\beta = -0,011 / \text{Gy}^2$, während sie 2018 für $\alpha = 0,464 / \text{Gy}$ und für $\beta = 0,003 / \text{Gy}^2$ betragen. Für die 5 Gy MRT-Gruppe konnte aus den Daten von 2017 ein $\alpha = 0,328 / \text{Gy}$ und ein $\beta = 0,003 / \text{Gy}^2$ sowie aus den Daten von 2018 ein $\alpha = 0,367 / \text{Gy}$ und ebenfalls ein $\beta = 0,003 / \text{Gy}^2$ berechnet werden. Die Kurven beider Gruppen waren durch einen insgesamt flachen und eher geraden Abfall der Überlebensfraktion ohne sichtbare „Schulter“ gekennzeichnet. In der Abbildung 4.17 sind die

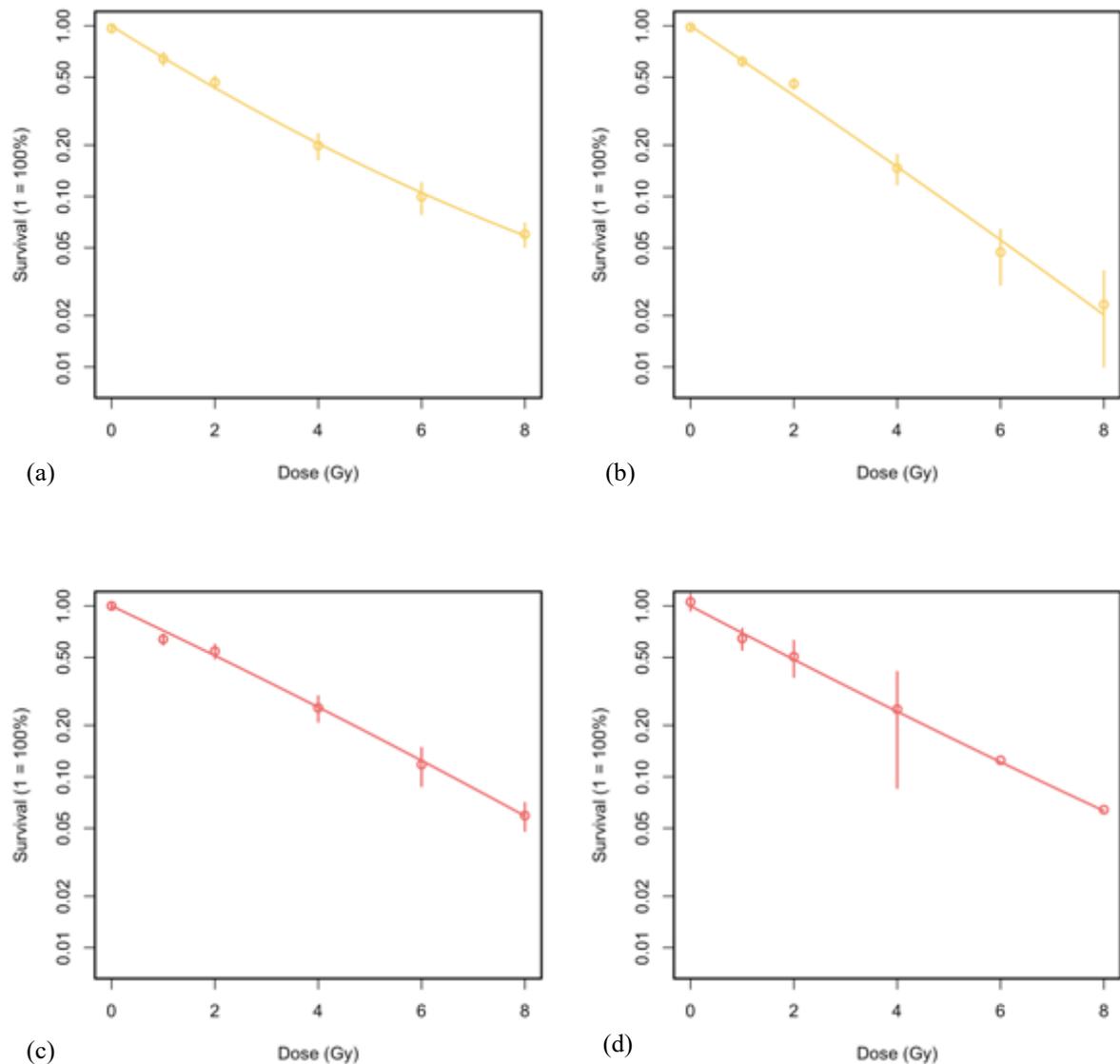


Abbildung 4.17 Gegenüberstellung der Überlebenskurven der mittels MRT bestrahlten Gruppen aus beiden CFA-Versuchsreihen

Die aus den Daten beider Versuchsreihen berechneten Überlebenskurven waren sich für die mittels MRT behandelten Versuchsgruppen am ähnlichsten. Für die 3 Gy-Gruppe errechneten sich 2017 (a) ein $\alpha = 0,440 / \text{Gy}$ und ein $\beta = -0,011 / \text{Gy}^2$, sowie 2018 (b) ein $\alpha = 0,464 / \text{Gy}$ und ein $\beta = 0,003 / \text{Gy}^2$. Die Regressionskurven der 5 Gy-Gruppe wiesen 2017 (c) ein $\alpha = 0,328 / \text{Gy}$ und ein $\beta = 0,003 / \text{Gy}^2$ auf, sowie 2018 (d) ein $\alpha = 0,367 / \text{Gy}$ und ebenfalls ein $\beta = 0,003 / \text{Gy}^2$. Alle hier dargestellten Kurven sind durch einen flachen und eher geraden Abfall der Überlebensfraktion gekennzeichnet.

Überlebenskurven beider MRT-Gruppen einander gegenübergestellt. Die Überlebenskurven der homogen bestrahlten Gruppen sowie der Kontrollen aus den beiden Versuchsreihen wichen stärker voneinander ab. Die Regressionskurve der Kontrollgruppe zeigte 2017 mit $\alpha = 0,407 / \text{Gy}$ und $\beta = -0,015 / \text{Gy}^2$ einen weitaus weniger steilen Abfall als diejenige von 2018, welche mit einem $\alpha = 0,187 / \text{Gy}$ sowie einen $\beta = 0,045 / \text{Gy}^2$ eine deutliche „Schulter“

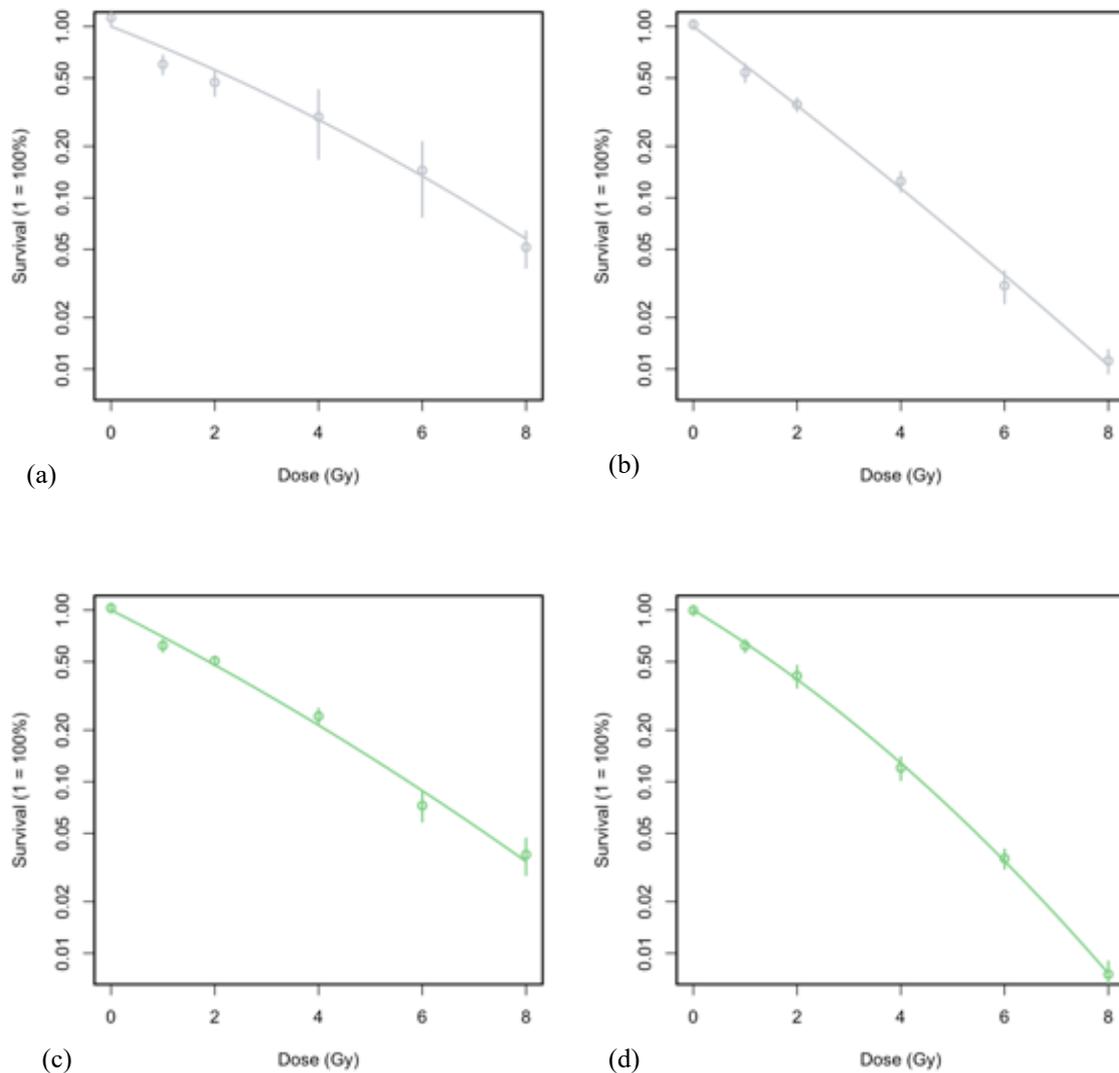


Abbildung 4.18 Gegenüberstellung der Überlebenskurven der homogen bestrahlten Gruppen aus beiden CFA-Versuchsreihen

Für die Überlebenskurven der mit 3 Gy homogen bestrahlten Zellen errechnete sich aus den Daten von 2017 (a) ein $\alpha = 0,270 /\text{Gy}$ und ein $\beta = 0,011 /\text{Gy}^2$, sowie aus den Daten von 2018 (b) ein $\alpha = 0,519 /\text{Gy}$ sowie ein $\beta = 0,006 /\text{Gy}^2$. Ein ähnlicher Unterschied zeigte sich zwischen beiden Versuchsreihen auch für die mit 5 Gy bestrahlten Zellen. Hier fand sich 2017 (c) ein $\alpha = 0,351 /\text{Gy}$ und ein $\beta = 0,009 /\text{Gy}^2$, sowie 2018 ein $\alpha = 0,418 /\text{Gy}$ und ein $\beta = 0,024 /\text{Gy}^2$. Graphisch verdeutlicht sich diese Abweichung für beide Gruppen in einem steileren Abfall der Überlebenskurven aus der Versuchsreihe 2018.

mit anschließend stärker abfallendem Verlauf aufwies. Beide Kurven werden graphisch in der Abbildung 4.16 verglichen. Auch für beide Gruppen, deren Zellen homogen bestrahlt worden waren, bestand dieser graphische Unterschied zwischen den Kurven beider Versuchsreihen. 2017 errechnete sich für die mit 3 Gy bestrahlten Zellen ein $\alpha = 0,270 /\text{Gy}$ und ein $\beta = 0,011 /\text{Gy}^2$, sowie für die mit 5 Gy bestrahlten Zellen ein $\alpha = 0,351 /\text{Gy}$ und ein $\beta = 0,009 /\text{Gy}^2$. Beide Kurven weisen einen weniger steilen Verlauf als ihr Pendant aus der

Versuchsreihe 2018 auf. Hier fand sich für die niedrigere Dosis von 3 Gy ein $\alpha = 0,519 /\text{Gy}$ sowie ein $\beta = 0,006 /\text{Gy}^2$ und für die höhere Dosis von 5 Gy ein $\alpha = 0,418 /\text{Gy}$ sowie ein $\beta = 0,024 /\text{Gy}^2$. In der Abbildung 4.18 findet sich eine graphische Gegenüberstellung der Überlebenskurven beider CFA-Versuchsreihen für die homogen bestrahlten Versuchsgruppen.

Zusammenfassung

Trotz der Tatsache, dass beide Datensätze aus den 2017 beziehungsweise 2018 durchgeführten Koloniebildungstests nicht direkt vergleichbar waren, ließen sich aus der getrennten Betrachtung beider Versuchsreihen und ihrem anschließenden Vergleich dennoch Schlüsse ziehen. Das klonogene Zellüberleben nach der Bestrahlung mit mehreren Testdosen, war für die beiden homogen bestrahlten Versuchsgruppen sowie für die 3 Gy MRT-Gruppe signifikant niedriger als das der Kontrolle. Für die 5 Gy MRT-Gruppe zeigten sich die Ergebnisse beider Versuchsreihen hingegen nicht kongruent. Innerhalb der mit dem *Gulmay* bestrahlten Tests unterschied sich ihre SF nur für die 8 Gy Dosis von derjenigen der Kontrolle. Die am *Xstrahl* bestrahlten CFA ließen für die 5 Gy MRT-Gruppe, im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen, allerdings eine deutliche höhere SF ab einer Testdosis von 4 Gy feststellen. Dieser Unterschied erwies sich jedoch als nicht signifikant. Auch der Vergleich der Überlebenskurven beider Versuchsreihen kam zu ähnlichen Ergebnissen. Die Kurven der mit 5 Gy homogen bestrahlten Zellen verliefen jeweils signifikant unterhalb der jeweiligen Referenzkurve der Kontrollen. Auch die Überlebenskurven der mit 3 Gy homogen bestrahlten Zellen, lagen unter den Kontrollkurven, allerdings in der Versuchsreihe von 2017 mit einem $p = .068$ statistisch nur annäherungsweise signifikant. Im Gegensatz hierzu wich für die 3 Gy MRT-Gruppe nur die 2017 erstellte Kurve von derjenigen der Kontrolle ab. Die größten Unterschiede konnten wiederum für diejenigen Zellen, welche eine MRT mit 5 Gy erhalten hatten, beobachtet werden. Ihre Überlebenskurve zeigte für die Daten, welche 2017 erhoben wurden, einen signifikant von derjenigen der Kontrolle abweichenden Verlauf, bei dem sie für die höheren Testdosen unter dieser lag. Für die 2018 durchgeführten Koloniebildungstests, verlief sie allerdings oberhalb der Referenzkurve. Mit einem $p = .066$ war diese Abweichung nahezu statistisch signifikant.

4.3 Chromosomenaberrationen

Gruppengröße und Anzahl der Metaphase Zellkerne

Für die Kontrollgruppe konnten insgesamt drei Zelllinien ausgewertet werden. Eine stammte aus einem zuvor „schein-bestrahlten“ Tumor, die anderen zwei aus jeweils unbestrahlten

Tumoren. Um die relativ kleine Größe der Gruppe zumindest teilweise zu kompensieren, wurden statt 500 für jede der Zelllinien etwa 1000 Metaphase-Zellkerne analysiert ($N_1 = 1.000$; $N_2 = 1.000$; $N_3 = 978$). Die anderen, zuvor in der *in vivo* Analyse der Wachstumsverzögerung untersuchten Kontrolltumoren, mussten aus verschiedenen Gründen von der FISH-Analyse ausgeschlossen werden. Jeweils drei der „schein-bestrahlten“ Tumoren waren zu klein und eine Isolation der Zellen war nicht erfolgreich. Eine weitere Zelllinie der „schein-bestrahlten“ Tumoren konnte initial zwar erfolgreich isoliert werden, eine dauerhafte Zellkultur war jedoch auch für sie nicht möglich. Auch für jeweils eine Zelllinie aus den unbestrahlten Tumoren war einerseits eine Isolation aufgrund des kleinen Tumorumfanges ohne Erfolg. Andererseits konnten Zellen aus einer initial erfolgreichen Isolation nicht dauerhaft in Zellkultur erhalten werden. Zusammenfassend konnten für die Kontrollgruppe also insgesamt drei der ursprünglich neun Tumoren in die FISH-Analyse eingeschlossen werden. Für die Gruppe der Tumorzellen, welche homogen mit 3 Gy bestrahlt worden waren, wurden insgesamt fünf Zelllinien der ursprünglich sechs Tumoren in die Auswertung mittels FISH eingeschlossen. Ein Tumor dieser Bestrahlungsgruppe wurde durch die Strahlenbehandlung kontrolliert und fiel deshalb für alle nachfolgenden Untersuchungen aus. Sieben Zelllinien bildeten die Gruppe von Tumorzellen, welche zuvor eine MRT mit 3 Gy erhalten hatten. Das entsprach allen auf diese Art behandelten Tumoren. Für die Gruppe von Zellen, welche homogen mit 5 Gy bestrahlt worden waren, konnten vier Zelllinien analysiert werden. Einer der initial sechs Tumoren dieser Gruppe wurde durch die vorausgehende Strahlenbehandlung kontrolliert und stand aus diesem Grund für keine weiteren Untersuchungen zur Verfügung. Die Zellen des zweiten nicht in die Analyse einbezogenen Tumors konnten zwar erfolgreich isoliert und kultiviert werden, alle Versuche einer *in situ* Hybridisierung blieben allerdings erfolglos. Für die 5 Gy MRT-Gruppe konnten ebenfalls vier Zelllinien in die FISH-Analyse eingeschlossen werden. Zwei der initial sieben Tumoren dieser Gruppe blieben sehr klein und eine Isolation sowie Zellkultur der Tumorzellen waren nicht erfolgreich. Die Färbungen einer weiteren erfolgreich kultivierten Zelllinie wurden ausschließlich von Tim Setzkorn, einem Masterstudenten, im Rahmen seines Praktikums ausgewertet. Sie wurde, um den statistischen Fehler durch eine *inter rater variability* möglichst klein zu halten, ebenfalls von der Analyse ausgeschlossen.

Für die vier bestrahlten Versuchsgruppen sollten pro Zelllinie jeweils 500 Metaphase-Zellkerne analysiert werden. Die tatsächliche Anzahl der in die Analyse eingeschlossenen Zellkerne lag für die Gruppe, welche homogen mit 3 Gy bestrahlt worden war bei 531,40 ($SD = 89,80$), für die Gruppe, an die die gleiche Dosis mittels Mikrostrahlen abgegeben worden war, bei 465,29 ($SD = 58,63$), für die homogen mit 5 Gy bestrahlte Gruppe bei 496,25 ($SD = 7,50$) und für die

Gruppe, die eine Dosis von 5 Gy durch Mikrostrahlen erhalten hatte, bei 491,75 ($SD = 13,38$). Für die Kontrollgruppe wurden somit insgesamt 2.978 Zellkerne untersucht. Beide mit 3 Gy bestrahlten Versuchsgruppen wiesen mit 2.657 analysierten Nuklei in der homogen bestrahlten Gruppe und 3.257 in der MRT-Gruppe eine ähnliche Größe auf. Die Gesamtzahl der analysierten Zellkerne wich für beide mit 5 Gy behandelten Gruppen allerdings deutlich von den anderen ab. In der homogen bestrahlten Gruppe wurden insgesamt 1.985, in der MRT-Gruppe 1.967 Metaphase-Zellkerne untersucht. In der Tabelle 4.12 sind die finalen Gruppengrößen zusammengefasst.

Tabelle 4.12 Anzahl der Zelllinien und Metaphase-Zellkerne die in die FISH-Analyse eingeschlossen werden konnten

| Gruppe | Zelllinien | Metaphasen |
|--------------|------------|------------|
| Kontrolle | 3 | 2978 |
| 3 Gy homogen | 5 | 2657 |
| 3 Gy MRT | 7 | 3257 |
| 5 Gy homogen | 4 | 1985 |
| 5 Gy MRT | 4 | 1976 |

Um die untersuchten Merkmale zwischen den unterschiedlich großen Gruppen vergleichen zu können, wurde jeweils der Gruppenmittelwert anteilig für 100 analysierte Zellkerne bestimmt. Unterschieden werden konnte zwischen den Chromosomen zwei und vier, welche grün beziehungsweise orange fluoreszierten, sowie zwischen den anderen in blau mit DAPI gegengefärbten Chromosomen, welche der Einfachheit halber im Folgenden als „weitere Chromosomen“ oder „andere Chromosomen“ bezeichnet werden. Zu den untersuchten Kategorien zählten die Anzahl der beobachteten Translokationen zwischen Chromosom zwei und vier, die sich als orange-grüne Chromosomen darstellten („*T orange-grün*“), sowie jeweils die Anzahl an Translokationen zwischen Chromosom zwei oder vier und einem anderen Chromosom, welche als orange-blaue oder grün-blaue Chromosomen sichtbar waren („*T blau-grün*“ und „*T blau-orange*“). Weiterhin wurden Insertionen („*I*“) dokumentiert. Eine weitere Kategorie stellten azentrische Chromosomen dar. Eingeschlossen wurden die am häufigsten dokumentierten, welche zum einen aus einem grünen und einem orangen Anteil bestanden („*AF 1O-1G*“) sowie zum anderen aus zwei grünen und entweder einem oder zwei orangen Anteilen („*AF 1O-2G*“ oder „*AF 2O-2G*“). Zusätzlich wurden Monosomien und Trisomien der Chromosomen zwei und vier („*Mono grün*“; „*Mono orange*“; „*Tri grün*“ und

„Tri orange“) analysiert. In der Abbildung 4.19 finden sich verschiedene beispielhafte unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtete Veränderungen.

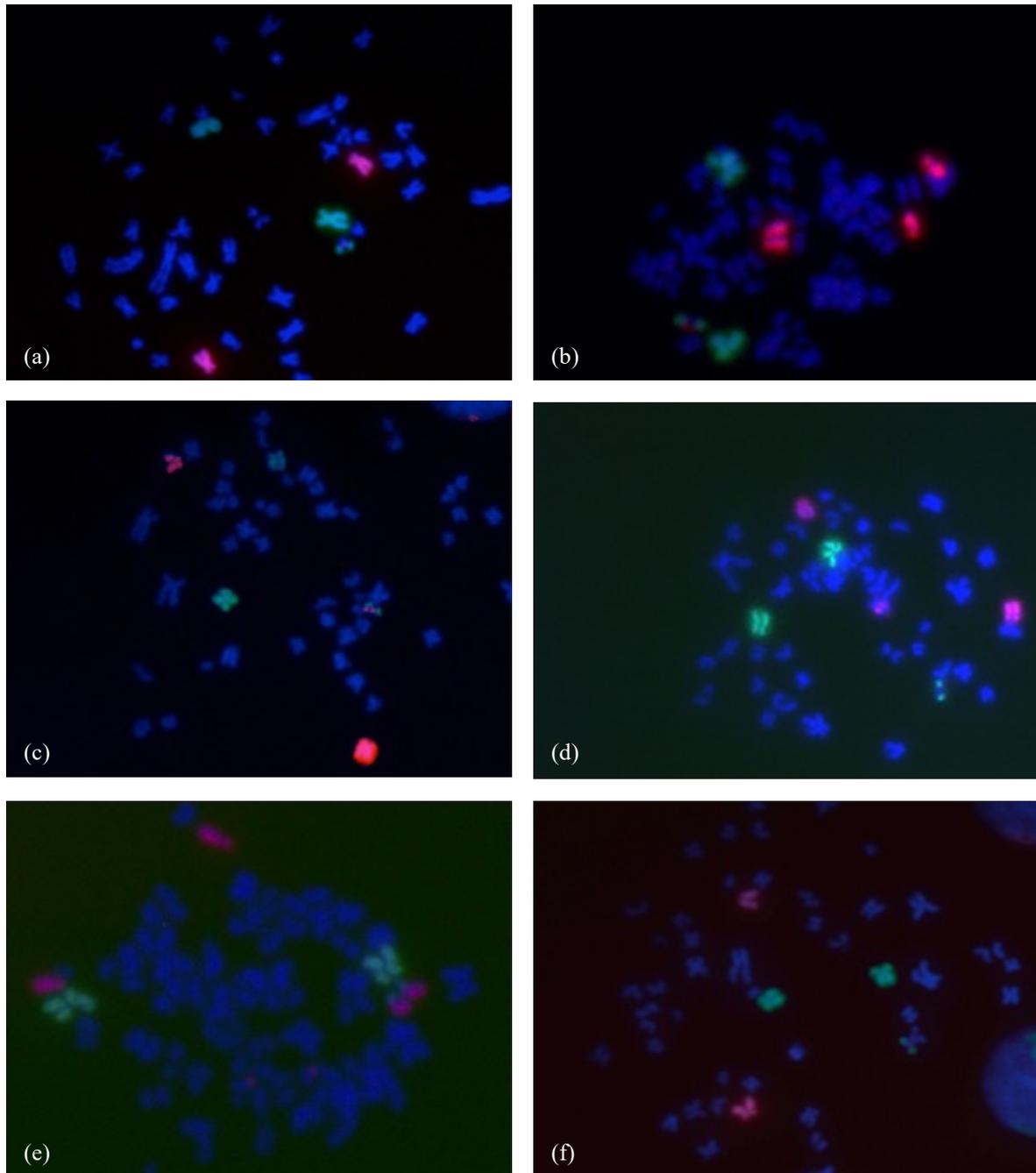


Abbildung 4.19 Metaphase-Zellkerne der FaDu-Tumorzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

Es sind einerseits zum Vergleich die drei unterschiedlich ausgeprägten azentrischen Chromosomen mit Anteilen der Chromosomen zwei und vier abgebildet: (a) *10-2G* in einem Zellkern der 5 Gy MRT-Gruppe, (b) *20-2G* aus der 3 Gy MRT-Gruppe und (c) zweimal *10-1G* aus der 5 Gy homogenen-Gruppe. Andererseits finden sich in den Abbildungen sowohl eine Insertion von Fragmenten des Chromosoms vier in ein weiteres Chromosom in einem Zellkern der Kontrollgruppe (d) als auch die verschiedenen Translokationsformen in jeweils zwei Zellkernen der 5 Gy homogenen-Gruppe: (e) *T blau-orange* und *T orange-grün* sowie (f) *T grün-blau*.

Translokationen

Auf 100 Metaphase-Zellkerne kamen in der Kontrollgruppe durchschnittlich 4,79 Translokationen ($SD = 2,33$). Davon waren 70,5 % ($SD = 13,4$) Translokationen zwischen Chromosom zwei und einem weiteren Chromosom. Translokationen zwischen Chromosom vier und einem weiteren Chromosom machten 26,7 % ($SD = 14,2$) aus und Translokationen zwischen den Chromosomen zwei und vier 2,8 % ($SD = 4,9$). In den bestrahlten Versuchsgruppen konnten vergleichsweise mehr Translokationen beobachtet werden. Von 100 analysierten Metaphase-Zellkernen wiesen nach einer Behandlung mit 3 Gy 14,91 Nuklei ($SD = 9,92$) der MRT-Gruppe und 11,02 Nuklei ($SD = 7,59$) der homogen bestrahlten Gruppe Translokationen auf. In der Gruppe der räumlich fraktioniert mit 5 Gy bestrahlten Tumorzellen fanden sich in 8,15 von 100 Zellkernen ($SD = 10,32$) Translokationen. In der mit 5 Gy homogen bestrahlten Gruppe waren es 8,86 ($SD = 1,45$). Der Vergleich der gruppenspezifischen Anzahl

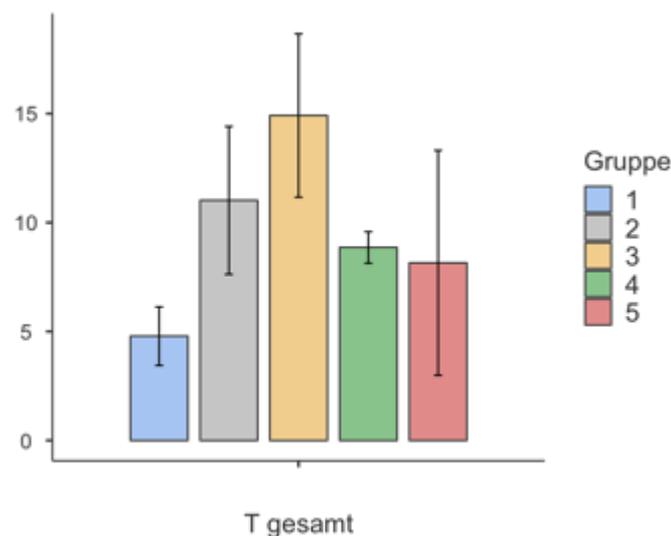


Abbildung 4.20 Gesamtanzahl der Translokationen pro 100 analysierten Metaphase-Zellkernen

In der Kontrollgruppe (1) fanden sich insgesamt pro 100 Zellkernen durchschnittlich 4,79 Translokationen. Alle bestrahlten Gruppen zeigten einen höheren Anteil an Zellkernen mit Translokationen. Für die mit 3 Gy homogen bestrahlten Zellen (2) lag dieser bei 11,02, in der 3 Gy MRT-Gruppe (3) bei 14,91, für die mit 5 Gy homogen bestrahlten Tumorzellen (4) bei 8,15, sowie in der 5 Gy MRT-Gruppe (5) bei 8,86. Statistisch signifikant war diese erhöhte Anzahl translozierter Chromosomenabschnitte sowohl für die Zellen, welche eine MRT mit 3 Gy erhalten hatten ($p = .037$), als auch für diejenigen, welche homogen mit 5 Gy bestrahlt worden waren ($p = .035$).

an Translokationen ist in Abbildung 4.20 dargestellt. Für jede Gruppe wird außerdem der prozentuale Anteil der unterschiedlichen Translokationen in der Abbildung 4.21 verdeutlicht. Für die homogen bestrahlten Gruppen war, wie in der Kontrollgruppe, der Anteil an

Translokationen zwischen Chromosom zwei und einem anderen Chromosom mit 74,9 % ($SD = 25,7$) für die 3 Gy Gruppe und 70,0 % ($SD = 21,1$) für die 5 Gy Gruppe am höchsten. In den mit Röntgen-Mikrostrahlen behandelten Tumorzellen war das Verhältnis der Translokationen zwischen Chromosom zwei und einem weiteren, sowie zwischen Chromosom vier und einem weiteren Chromosom ausgeglichener. In der 5 Gy-Gruppe besaßen beide einen Anteil von etwa 47 % ($T\% \text{ blau-grün}$: 46,6 %, $SD = 34,7$ und $T\% \text{ blau-orange}$: 46,7 %, $SD = 38,4$). In der 3 Gy Gruppe waren 57,1 % ($SD = 31,1$) der Translokationen „blau-grün“, sowie 40,8 % ($SD = 32,1$) „blau-orange“. Den kleinsten Anteil machten, wie zu erwarten, Translokationen zwischen den Chromosomen zwei und vier aus. Er lag in allen Versuchsgruppen zwischen etwa 2 % und 15 %.

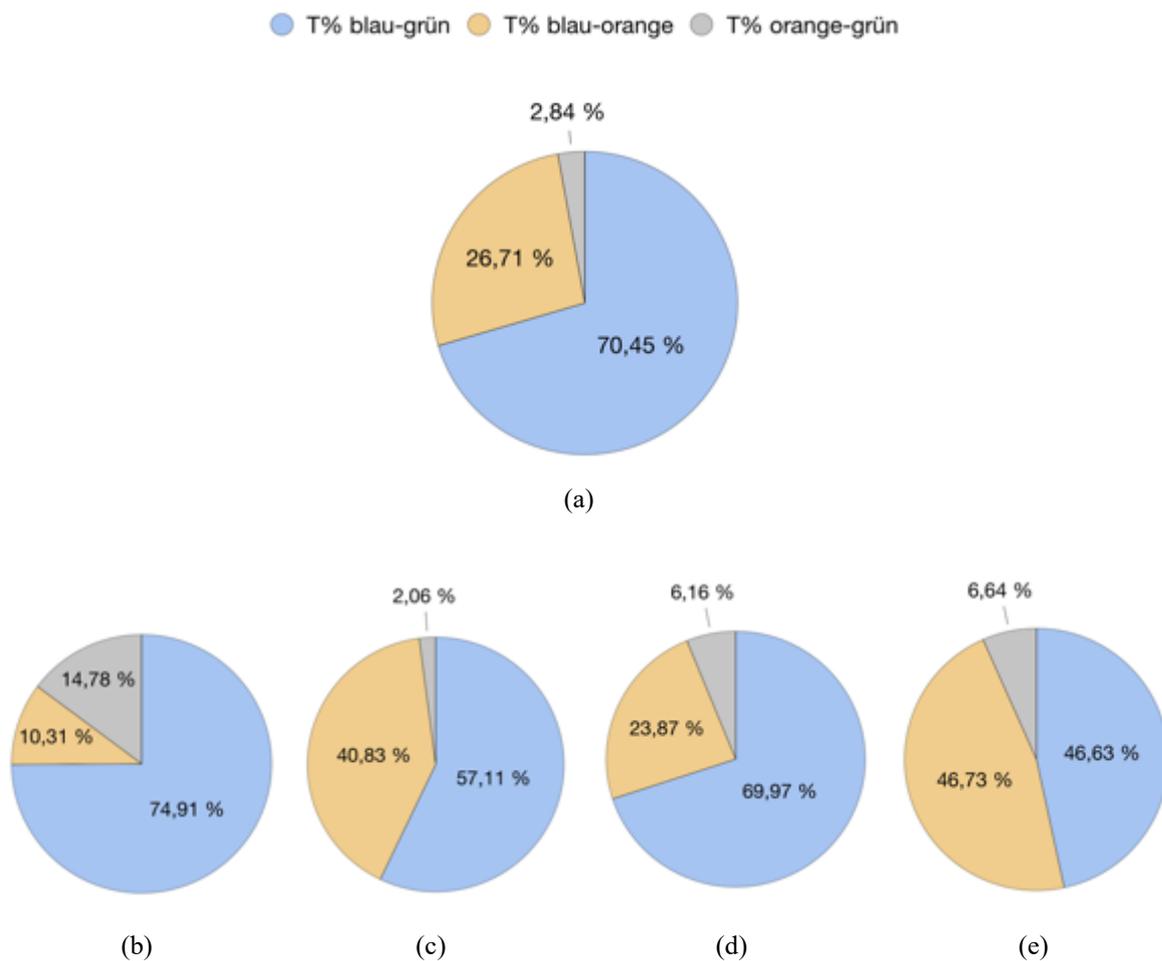


Abbildung 4.21 Prozentualer Anteil der verschiedenen Translokationen für alle Versuchsgruppen

In der Kontrollgruppe (a), sowie in den homogen mit 3 Gy (b) und 5 Gy (d) bestrahlten Gruppen machten die Translokationen zwischen Chromosom zwei und einem weiteren Chromosom („ $T\% \text{ blau-grün}$ “) mehr als zwei Drittel aller Translokationen aus, während ihr Anteil in den mittels Röntgen-Mikrokanälen bestrahlten Gruppen, (c) 3 Gy und (e) 5 Gy, durchschnittlich nur etwa die Hälfte der gesamten Translokationen ausmachte. Diese unterschiedliche Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Translokationen zeigte sich in individuell durchgeführten t-Tests jedoch als statistisch nicht signifikant ($p > .05$).

Die Streuung der Anzahl an Translokationen war innerhalb aller Gruppen hoch. Sie war in der 5 Gy MRT-Gruppe besonders ausgeprägt. Für deren Datenpunkte konnte, im Gegensatz zu den anderen Datenreihen, keine Normalverteilung angenommen werden (Shapiro-Wilk: $W = 0.762$; $p = .017$). Dementsprechend wurden um die unterschiedliche Anzahl an Translokationen innerhalb der bestrahlten Versuchsgruppen mit derjenigen der Kontrollgruppe auf statistische Signifikanz zu überprüfen individuelle t-Tests durchgeführt. Eine signifikant höhere Anzahl an Translokationen fand sich sowohl für Tumorzellen, welche eine MRT mit 3 Gy erhalten hatten, als auch für solche, die mit 5 Gy homogen bestrahlt worden waren (3 Gy MRT: $t(7.28) = 2.54$; $p = .037$; 5 Gy homogen: $t(5.00) = 2.88$; $p = .035$). Für die höhere Frequenz an Translokationen in Tumorzellen, welche homogen mit 3 Gy sowie räumlich fraktioniert mit 5 Gy bestrahlt worden waren, waren ein t-Test nach Student beziehungsweise ein Mann-Whitney-U-Test jeweils nicht signifikant ($p > .05$). Auch zwischen den verschiedenen Bestrahlungsmodi ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der beobachteten Häufigkeit von Translokationen. Die unterschiedliche Häufigkeitsverteilung der Translokationen zwischen den Chromosomen zwei oder vier und jeweils einem anderen Chromosom („T blau-grün“ und „T blau-orange“) innerhalb der Gruppen, welche eine MRT-Behandlung erhalten hatten, zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls als statistisch nicht signifikant (jeweils $p > .05$). Allerdings ergab ein t-Test für den verschieden großen Anteil an Translokationen von Chromosom zwei mit einem weiteren Chromosom für die 5 Gy MRT-Gruppe im Vergleich zu ihrem homogen bestrahlten Pendant einen signifikanten Unterschied ($t(6.00) = 2.48$; $p = .048$).

Azentrische Chromosomen

In fast jedem analysierten Zellkern fanden sich, unabhängig von der vorausgehenden Tumorbehandlung, ein, zwei oder selten auch mehr azentrische Fragmente mit Anteilen der Chromosomen zwei und vier. Deshalb wurde das Vorkommen dieses Merkmal als Anzahl pro Nukleus ausgewertet. In jedem Zellkern der Kontrollgruppe fanden sich durchschnittlich 1,15 azentrische Fragmente ($SD = 0,04$). Für eine homogene Bestrahlung schien die Zahl mit steigender Dosis zuzunehmen. Für die mit 3 Gy bestrahlte Gruppe konnten 1,21 ($SD = 0,25$) und in der mit 5 Gy bestrahlten 1,28 ($SD = 0,25$) azentrische Chromosomen dokumentiert werden. Dieser Zusammenhang ist in der Abbildung 4.22 graphisch verdeutlicht. Die Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich in durchgeführten t-Tests allerdings als statistisch nicht signifikant ($p > .05$). Auch beide mittels MRT behandelte Gruppen zeigten eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Anzahl an azentrischen Chromosomen. Untereinander unterschied sich deren Zahl allerdings weniger. Die mit 3 Gy bestrahlten Zellen wiesen im Mittel 1,28 azentrische Chromosomen ($SD = 0,12$) auf, während für die mit 5 Gy bestrahlten

Zellen durchschnittlich 1,26 ($SD = 0,24$) dokumentiert werden konnten. Dies ließ, anders als für eine homogene Bestrahlung, keine Dosisabhängigkeit dieser chromosomalen Veränderungen vermuten. In der Abbildung 4.23 wird dies auch graphisch deutlich.

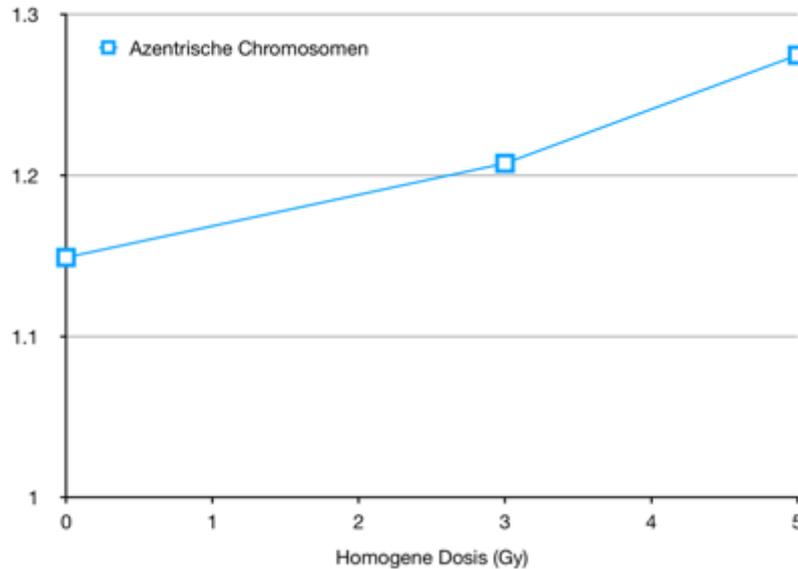


Abbildung 4.22 Anzahl der azentrischen Chromosomen in Abhängigkeit von der homogen applizierten Dosis

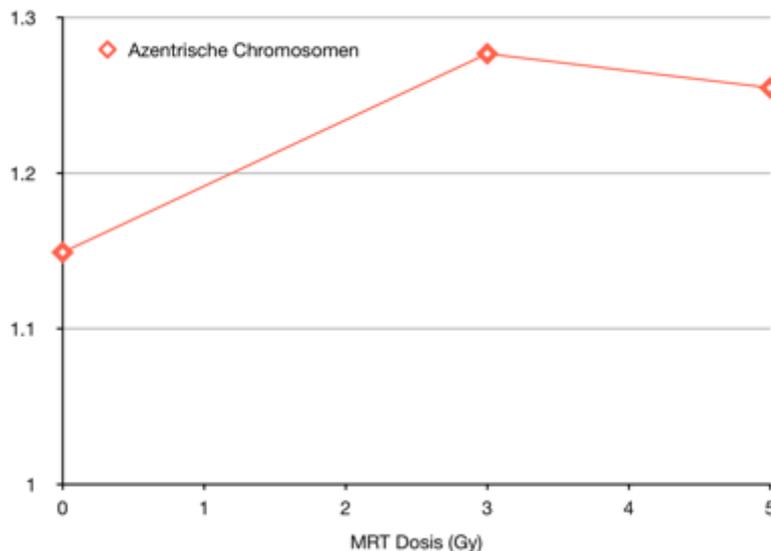


Abbildung 4.23 Anzahl der azentrischen Chromosomen in Abhängigkeit von der mittels MRT applizierten Dosis

Die größere Anzahl an azentrischen Chromosomen zeigte sich in einem t-Test nach Welch statistisch signifikant für die mit einer 3 Gy MRT bestrahlten Zellen ($t(7.984) = 2.734$; $p = .026$) nicht jedoch für diejenigen, die eine Dosis von 5 Gy erhalten hatten ($p > .05$). Zusätzlich

zu den dosisabhängigen Darstellungen der Anzahl azentrischer Chromosomen für jeden Bestrahlungsmodus, stellt die Abbildung 4.24 diese für alle Gruppen gegenüber.

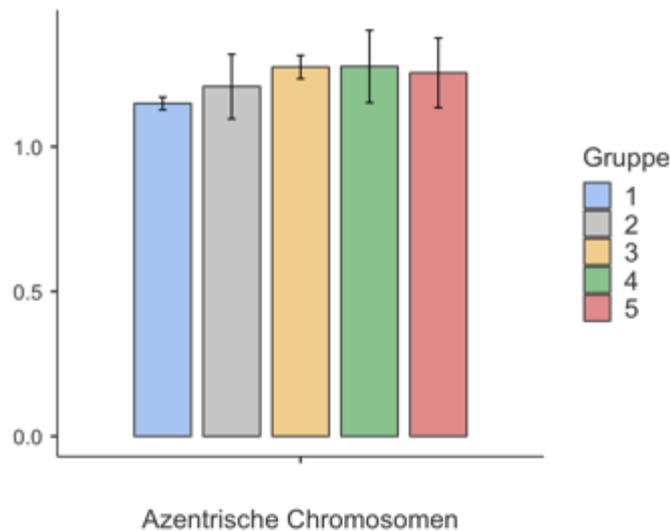


Abbildung 4.24 Anzahl der azentrischen Chromosomen pro Zellkern für alle Versuchsgruppen

Innerhalb der Kontrollgruppe (1) fanden sich im Mittel 1,15 azentrische Chromosomen pro Zellkern. Die Anzahl azentrischer Fragmente lag in den bestrahlten Gruppen etwas höher. In der 3 Gy homogen-Gruppe (2) lag sie bei 1,21, in der 3 Gy MRT-Gruppe (3) bei 1,28, in der 5 Gy homogen-Gruppe (4) bei ebenfalls 1,28 und in der 5 Gy MRT-Gruppe bei 1,26. Diese Unterschiede waren jedoch in einer ANOVA statistisch nicht signifikant ($p > .05$).

Die prozentuale Verteilung der verschiedenen azentrischen Chromosomen verschob sich innerhalb aller bestrahlter Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu Gunsten der Fragmente mit jeweils einem grünen und einem orangenen Anteil. Während sie innerhalb der Kontrolle bei etwa einem Drittel lagen, machten sie in den bestrahlten Zellen im Durchschnitt mehr als die Hälfte aus. In den zuvor homogen bestrahlten Gruppen lag ihr Anteil bei 53,8 % ($SD = 26,2$) für die mit 3 Gy behandelten Zellen, sowie bei 51,0 % ($SD = 34,1$) für diejenigen, die eine Dosis von 5 Gy erhalten hatten. Tumorzellen, welche zuvor mit Röntgen-Mikrostrahlen bestrahlt worden waren, zeigten bei einer Dosis von 3 Gy 55,6 % ($SD = 16,0$), sowie bei einer Dosis von 5 Gy 48,3 % ($SD = 28,5$) azentrische Fragmente, die aus jeweils einem Anteil beider markierter Chromosomen bestanden. Azentrische Chromosomen mit jeweils zwei Anteilen der Chromosomen zwei und vier, welche in der Kontrollgruppe mehr als die Hälfte ausmachten, stellten in den bestrahlten Versuchsgruppen dementsprechend einen geringeren Anteil. Für die 3 Gy homogen-Gruppe lag dieser bei 32,1 % ($SD = 16,5$), für die 3 Gy MRT-Gruppe bei 31,2 % ($SD = 17,8$), für die 5 Gy homogen-Gruppe bei 36,1 % ($SD = 25,8$) sowie für die 5 Gy MRT-Gruppe bei 42,2 % ($SD = 25,8$). Der Anteil der

azentrischen Chromosomen mit einem orangenen und zwei grünen Fragmenten lag in den Versuchsgruppen, ähnlich wie in der Kontrollgruppe, zwischen 9,6 % und 14,1 %. Die prozentuale Verteilung der azentrischen Chromosomen ist graphisch in der Abbildung 4.25 verdeutlicht.

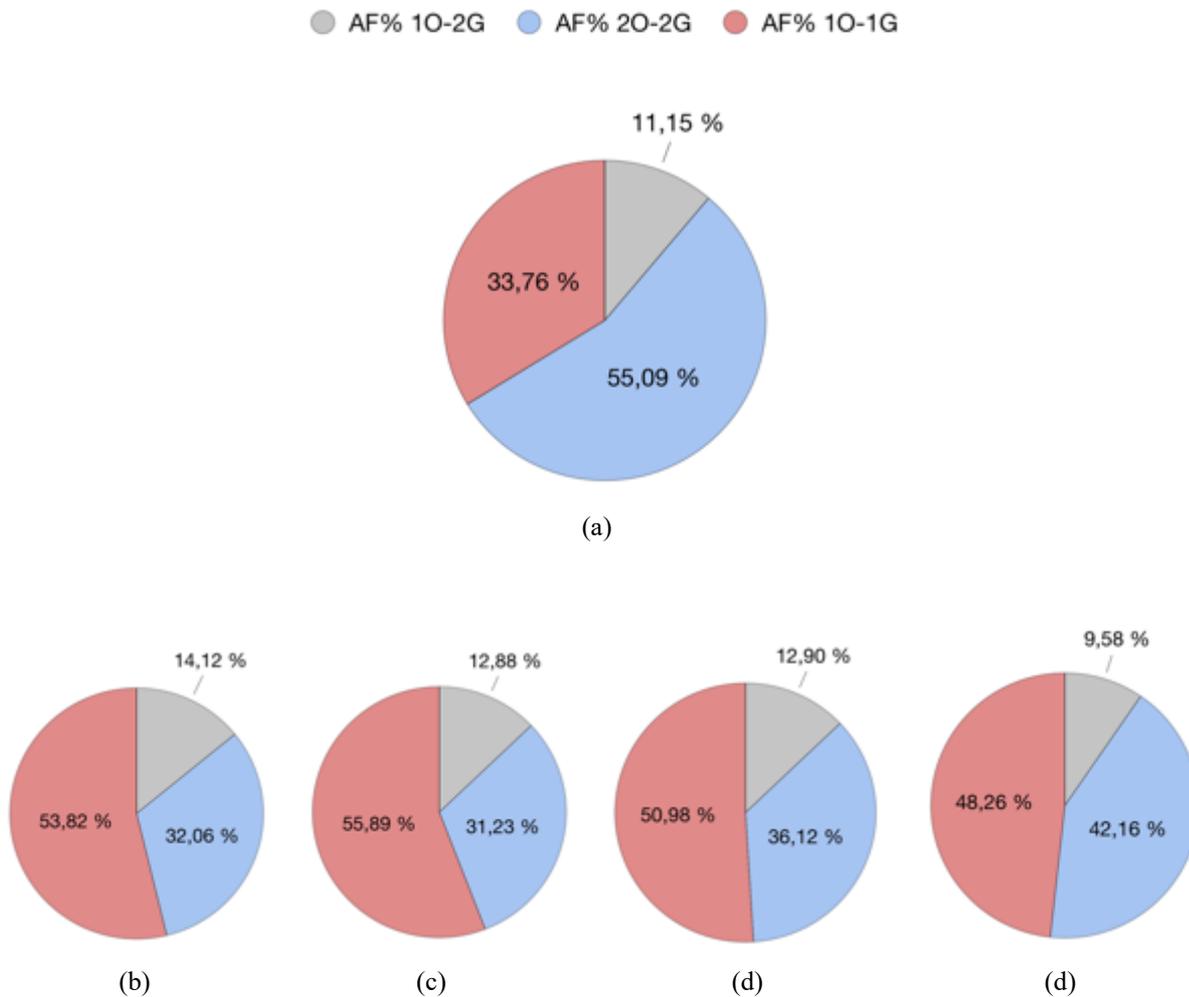


Abbildung 4.25 Prozentualer Anteil der verschiedenen azentrischen Chromosomen für alle Gruppen

In der Kontrollgruppe (a) machten azentrische Fragmente mit jeweils zwei Anteilen der Chromosomen zwei (grün) und vier (orange) (*AF 20-2G*) über die Hälfte der azentrischen Chromosomen aus. In den bestrahlten Versuchsgruppen: (b) homogen 3 Gy, (c) MRT 3 Gy, (d) homogen 5 Gy und (e) MRT 5 Gy, stellten die azentrischen Chromosomen mit jeweils einem Anteil beider Chromosomen (*AF 10-1G*) den größten Anteil. Ein statistisch signifikantes Ergebnis ergab sich für die Erhöhung der *AF 10-1G* innerhalb der 3 Gy MRT-Gruppe ($p = .012$) sowie für den niedrigeren Anteil an *AF 20-2G* innerhalb beider mit 3 Gy bestrahlten Gruppen (3 Gy homogen: $p = .034$; 3 Gy MRT: $p = .012$).

Die Überprüfung der Unterschiede in der prozentualen Verteilung der verschiedenen azentrischen Fragmente auf statistische Signifikanz geschah mittels individueller t-Tests, in denen jede bestrahlte Gruppe mit der Kontrolle verglichen wurde. Der im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Anteil an azentrischen Fragmenten mit je einem grünen und einem

orangenen Anteil (*AF 10-1G*) zeigte sich ausschließlich für die 3 Gy MRT-Gruppe als statistisch signifikant ($t(7.75) = 3,28$; $p = .012$). Eine zusätzliche statistische Signifikanz fand sich für den im Gegenzug im Vergleich zu den Kontrollen niedrigeren Anteil an azentrischen Chromosomen mit jeweils zwei grünen und zwei orangenen Anteilen (*AF 20-2G*) für beide zuvor mit 3 Gy bestrahlten Gruppen (3 Gy homogen: $t(4.40) = 3.05$; $p = .034$; 3 Gy MRT: $t(6.69) = 3.44$; $p = .012$).

Aneuploidie

Für die abweichende Anzahl an Kopien von den Chromosomen zwei und vier schien es generell so, als ob sowohl Trisomien als auch Monosomien der beiden häufiger in der Kontrollgruppe und in den Zelllinien, welche eine Bestrahlung mit Röntgen-Mikrokanälen erhalten hatten, vorkamen als in den Gruppen, deren Tumorzellen homogen bestrahlt worden waren. Dies war für die Trisomien deutlicher als für die Monosomien. Auf 100 analysierte Metaphase-Zellkerne kamen in der Kontrollgruppe 1,91 Trisomien des Chromosoms vier ($SD = 0,88$) sowie 2,11 Trisomien des Chromosoms zwei ($SD = 1,09$). In den mittels Röntgen-Mikrokanälen bestrahlten Zelllinien lag die Häufigkeit einer Trisomie des Chromosoms vier bei 1,40 ($SD = 1,61$) für die 3 Gy-Gruppe, sowie bei 1,45 ($SD = 1,30$) für die 5 Gy-Gruppe. Eine Trisomie des Chromosoms zwei kam in 1,92 ($SD = 2,17$) von 100 Zellen, welche eine Dosis von 3 Gy erhalten hatten und in 2,26 ($SD = 1,41$) von 100 Zellen, welche mit 5 Gy bestrahlt worden waren, vor. In den homogen bestrahlten Zelllinien konnten diese Veränderungen weniger häufig beobachtet werden. Nach einer applizierten Dosis von 3 Gy kamen auf 100 analysierte Metaphase-Zellkerne 0,94 ($SD = 1,40$) Trisomien des Chromosoms vier und 0,65 ($SD = 0,86$) Trisomien des Chromosoms zwei. Diese Frequenz betrug in den Tumorzellen, welche eine Dosis von 5 Gy erhalten hatten, 0,40 ($SD = 0,28$) für Trisomien des Chromosoms vier sowie 0,46 ($SD = 0,30$) für Trisomien des Chromosoms zwei. Die unterschiedliche Häufigkeit an beobachteten Trisomien ist in der Abbildung 4.26 graphisch dargestellt. Für sie zeigte eine einfaktorielle Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis allerdings ein nicht signifikantes Ergebnis ($p > .05$).

Die Anzahl an Monosomien des Chromosoms vier lag in allen Gruppen in etwa zwischen 2,4 und 4,4 pro 100 analysierten Metaphase-Zellkernen, wobei die niedrigsten Frequenzen in den beiden homogen bestrahlten Gruppen gefunden werden konnten. Sie betragen 2,37 ($SD = 1,82$) für die mit 5 Gy behandelten Zellen und 3,04 ($SD = 3,37$) für die mit 3 Gy behandelten. Innerhalb der Kontrollgruppe fand sich diese numerische Veränderung in durchschnittlich 4,15 ($SD = 1,93$) von 100 Zellen. Die 3 Gy MRT-Gruppe lag mit einer Anzahl von 3,11 ($SD = 2,27$)

in der Nähe beider homogen bestrahlter Gruppen, während die 5 Gy MRT-Gruppe mit 4,35 ($SD = 2,18$) pro 100 Zellkernen die höchste Anzahl an Monosomien des Chromosoms vier aufwies. Diese Verteilung war für Monosomien des Chromosoms zwei ähnlich ausgeprägt. Sie kamen mit in etwa 1,4 – 3,5 pro 100 untersuchten Zellkernen etwas weniger häufig vor. Auch hier wurden sie mit 1,42 ($SD = 0,52$) und 2,32 ($SD = 2,37$) am seltensten in den zuvor homogen mit 5 Gy beziehungsweise 3 Gy bestrahlten Tumorzellen beobachtet. In der Kontrollgruppe lag der Anteil von Zellen, in denen eine Monosomie des Chromosoms zwei gefunden werden konnte, bei 2,98 ($SD = 2,39$) pro 100. Am häufigsten konnte diese numerische Veränderung in beiden mittels MRT behandelten Gruppen dokumentiert werden. Sie lag bei 3,11 ($SD = 3,24$)

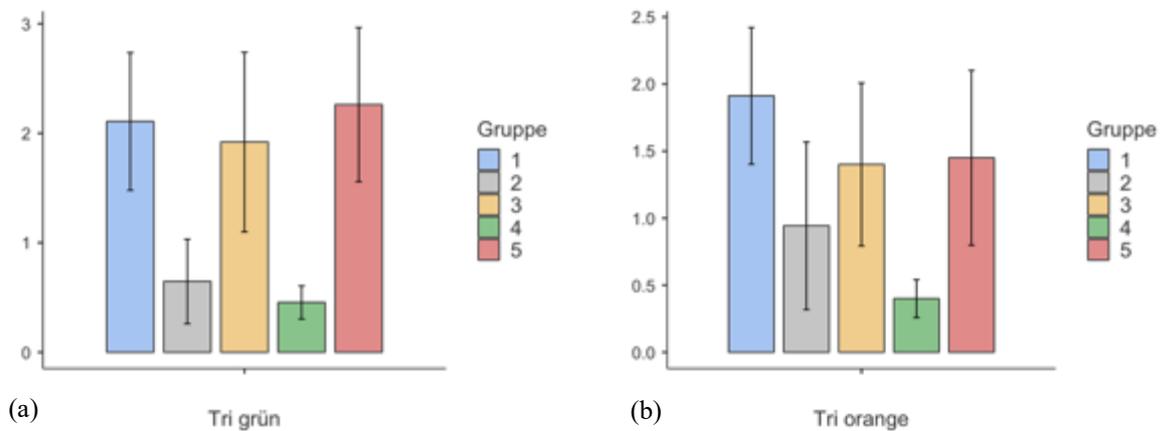


Abbildung 4.26 Anzahl der Trisomien pro 100 analysierten Metaphase-Zellkernen

Sowohl die Trisomie von Chromosom zwei (a) als auch diejenige von Chromosom vier (b) konnten weniger häufig in den Zellen beobachtet werden, welche zuvor homogen bestrahlt worden waren ((2) 3 Gy, (4) 5 Gy). In den mittels Röntgen-Mikrostrahlen behandelten Tumorzellen ((3) 3 Gy, (5) 5 Gy) wurde eine ähnliche Anzahl wie in der Kontrollgruppe (1) gefunden.

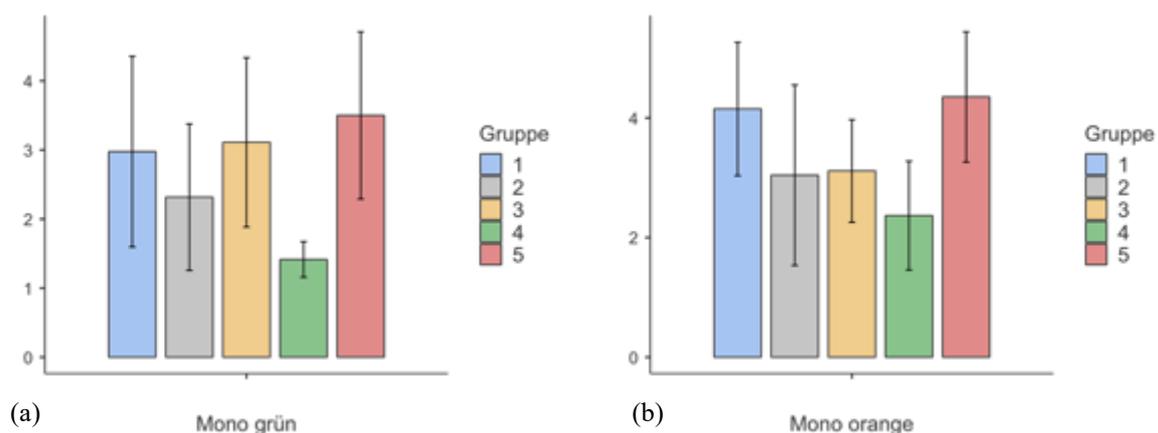


Abbildung 4.27 Anzahl der Monosomien pro 100 analysierten Metaphase-Zellkernen

Wenn auch nicht so deutlich wie bei der Verteilung der Trisomien, zeigte sich zum einen eine ähnliche Anzahl von Monosomien der Chromosomen zwei (a) und vier (b) in den Tumorzellen, welche mittels Röntgen-Mikrostrahlen behandelt worden waren ((3) 3 Gy, (5) 5 Gy) und der Kontrollgruppe (1). Zum anderen konnte eine geringere Häufigkeit dieser Veränderungen in den homogen bestrahlten Zelllinien ((2) 3 Gy, (4) 5 Gy) beobachtet werden.

für die 3 Gy-Gruppe, sowie bei 3,50 ($SD = 2,42$) für die 5 Gy-Gruppe. Auch diese Unterschiede waren in einer einfaktoriellem Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis allerdings nicht signifikant ($p = .05$). Die Häufigkeiten der Monosomien sind in der Abbildung 4.27 dargestellt.

Insertionen

Insertionen waren insgesamt selten und konnten lediglich in der Kontrollgruppe, sowie für Tumorzellen, welche zuvor räumlich fraktioniert mit 3 Gy oder homogen mit 5 Gy bestrahlt worden waren, beobachtet werden. Für jeweils zwei der drei Zelllinien in der Kontrollgruppe konnten in drei der gewerteten Metaphase-Zellkerne Insertionen festgestellt werden. Dreimal waren Fragmente des Chromosoms vier in weitere Chromosomen integriert. Zweimal fanden sich blau markierte Fragmente und einmal ein grünes Fragment von Chromosom zwei im Chromosom vier. Das entsprach einer Frequenz von 0,20 ($SD = 0,18$) Insertionen pro 100 analysierten Metaphase-Zellkernen. In der 3 Gy MRT-Gruppe wurden in zwei der

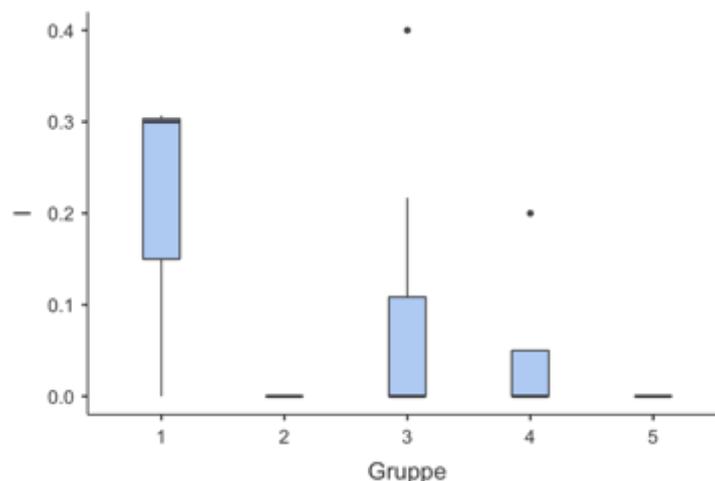


Abbildung 4.28 Anzahl der Insertionen pro 100 analysierten Metaphase-Zellkernen

In der Kontrollgruppe (1) fand sich, mit 0,20 Insertionen pro 100 Zellkernen, die höchste Frequenz an Insertionen. Innerhalb der 3 Gy MRT-Gruppe (3) betrug sie 0,09 und in der 5 Gy homogen-Gruppe (4) 0,05. Weder in der Gruppe von Zellen, welche homogen mit 3 Gy bestrahlt worden waren (2), noch in der 5 Gy MRT-Gruppe konnten Insertionen beobachtet werden. Diese Unterschiede zeigten sich statistisch nicht signifikant ($p > .05$).

insgesamt sieben analysierten Zelllinien Insertionen gefunden. Die eine zeigte eine Insertion eines orangenen Fragmentes von Chromosom vier in Chromosom zwei, die anderen jeweils eine Insertion eines grünen Fragmentes von Chromosom zwei in entweder Chromosom vier oder in ein weiteres Chromosom. Die Häufigkeit der Insertionen betrug für diese Gruppe somit 0,09 ($SD = 0,16$) pro 100 analysierten Metaphase-Zellkernen. Von den vier in die Analyse eingeschlossenen, zuvor homogen mit 5 Gy bestrahlten Zelllinien wies eine eine Insertion eines

blau fluoreszierenden Fragmentes eines weiteren Chromosoms in Chromosom vier auf. Folglich fanden sich hier 0,05 ($SD = 0,10$) Insertionen pro 100 untersuchten Metaphase-Zellkernen. Die Verteilung der Insertionen ist in der Abbildung 4.28 dargestellt. Für das häufigere Vorkommen von Insertionen in den nicht beziehungsweise „schein“-bestrahlten Tumorzellen war eine Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis nicht signifikant ($p > .05$).

Zusammenfassung

Für jede experimentelle Gruppe wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie etwa 2.000 – 3.250 Metaphase-Zellkerne auf Chromosomenaberrationen hin untersucht. In den bestrahlten Zelllinien konnten vergleichsweise mehr Translokationen beobachtet werden als in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war jeweils für die räumlich fraktioniert mit 3 Gy und die homogen mit 5 Gy bestrahlten Tumorzellen signifikant. In Hinblick auf die absolute Frequenz von azentrischen Chromosomen konnte kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den mit ionisierenden Strahlen behandelten Gruppen festgestellt werden. Jedoch zeigte sich ein unterschiedliches Verhältnis der am häufigsten beobachteten Konstellationen der azentrischen Fragmente mit Anteilen aus den Chromosomen zwei und vier. Die veränderte Häufigkeitsverteilung war zum einen in Bezug auf einen höheren Anteil an azentrischen Chromosomen mit jeweils einem grünen und einem orangenen Fragment für die 3 Gy MRT-Gruppe signifikant. Zum anderen zeigte sich ebenfalls in Hinblick auf den geringeren Anteil an azentrischen Chromosomen mit jeweils zwei grünen und zwei orangenen Abschnitten für beide mit 3 Gy bestrahlten Gruppen ein statistisch signifikantes Ergebnis. Zwischen den unterschiedlichen Bestrahlungsmodi konnte in Hinblick auf die untersuchten chromosomalen Veränderungen kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

5 Diskussion

5.1 Tumorwachstumsverzögerung

Die Analyse des Tumorwachstums zeigte lediglich für die mit 5 Gy homogen bestrahlte Versuchsgruppe eine Verzögerung des Wachstums um durchschnittlich etwa 9,5 Tage, welche sich allerdings statistisch nicht als signifikant erwies ($p = .096$). Das Wachstum der Tumoren aller anderen bestrahlten Gruppen unterschied sich mit einer Abweichung von jeweils etwa einem Tag nur unwesentlich von demjenigen der Kontrollgruppe. Allerdings fiel auf, dass der am langsamsten wachsende Kontrolltumor bis zum Erreichen des Endpunktes etwa 27,3 Tage benötigte, während es in jeder der bestrahlten Gruppen mindestens einen Tumor gab, dessen Wachstumsperiode 30 Tage oder mehr betrug. Im Falle beider mit 3 Gy bestrahlten Gruppen waren es jeweils zwei mit 29,8 Tagen und 35,0 Tagen für die homogen bestrahlten Tumoren sowie mit 30,3 Tagen und 35,5 Tagen für solche, die eine MRT erhalten hatten. In der 5 Gy MRT-Gruppe fand sich ein Tumor, dessen Wachstumsdauer mit 34,8 Tagen ebenfalls oberhalb von 30 Tagen lag. Unter den homogen mit 5 Gy bestrahlten Tumoren, die als einziges auch ein durchschnittlich verzögertes Wachstum zu zeigen schienen, waren es mit 36,2 Tagen, 37,6 Tagen und 42,2 Tagen drei. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass sowohl die Röntgen-Mikrokanäle als auch die konventionelle Röntgenstrahlung, welche an der MuCLS erzeugt wurden, zumindest bei einem Teil der Tumoren eine Wachstumsverzögerung hervorrufen konnte. Somit stellt sich die Frage, welche Parameter Einfluss auf das Tumorwachstum und die Wirksamkeit der Bestrahlung genommen haben und so zu diesem heterogenen Ergebnis geführt haben könnten. Vor diesem Hintergrund sollen im Folgenden besonders die Aspekte des Tumor-Ohr-Modells und der Bestrahlungsparameter beleuchtet werden. Auch Charakteristiken der Kopf-Hals-Tumoren selbst, sowie insbesondere der FaDu-Tumorzellen werden thematisiert. Des Weiteren wird ein Vergleich mit Ergebnissen anderer Studien an alternativen Strahlenquellen durchgeführt.

Tumormodell

Das für diese Studie verwendete Tumor-Ohr-Modell folgt, wie zuvor beschrieben, einer Versuchsreihe mit Partikelstrahlung von Forschenden des Helmholtz-Zentrums und der Technischen Universität in Dresden (Brückner et al., 2014, Oppelt et al., 2015 und Beyreuther et al., 2017). Innerhalb dieser konnten Parameter identifiziert werden, welche zu einem möglichst stabilen und schnellen Tumorwachstum führten. Hierzu zählten die Qualität der Zellsuspension, die Injektion selber sowie der richtige Bestrahlungszeitpunkt. Es konnte

ermittelt werden, dass pro Versuchstier idealerweise 20 – 30 μl Zellsuspension, bestehend aus purem Matrigel, à 10^5 Zellen injiziert werden sollten. Eine geringere applizierte Zellzahl könnte laut der Autor*innen zu einer initialen Wachstumsverlangsamung führen. Weiters wurde für den optimalen Zeitpunkt der Bestrahlung ein Tumolvolumen von etwa 10 mm^3 bestimmt, was einer Tumordimension von ca. $3\text{ mm} \cdot 2,5\text{ mm}$ entspricht. Der Grund hierfür war das beobachtete Wachstumsverhalten der FaDu-Zellen, welche sich bis zum Heranwachsen der Raumforderung auf einen Durchmesser von 2,5 mm in Zellclustern entwickelten, die sich erst im zeitlichen Verlauf zu einem soliden Tumor verbanden. Voraussetzung hierfür war zusätzlich der vollständige Abbau des Matrigels, der eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt. Auch anhand von Versuchen mit anderen Tumorzellen in Mäuseohren schien ein Tumolvolumen zwischen 5 mm^3 und 10 mm^3 ein genereller Parameter für den Beginn der exponentiellen Wachstumsphase zu sein (Beyreuther et al., 2017). Die Kombination mehrerer Umstände der für diese Arbeit durchgeführten Versuche lässt vermuten, dass zumindest ein Teil der FaDu-Tumoren zu früh bestrahlt wurde. Dies könnte das heterogene Wachstum innerhalb der unterschiedlichen Versuchsgruppen erklären. Einen Aspekt stellt die Tumorgöße zum Bestrahlungszeitpunkt dar. Das an der MuCLS zur Verfügung stehende Bestrahlungsfeld limitierte die Tumordimensionen auf $2,3\text{ mm} \cdot 2,3\text{ mm}$, beziehungsweise $1,5 \cdot 2,8 \cdot \pi\text{ mm}^2$, was dazu führte, dass die meisten Tumoren bereits mit einer Größe von $2\text{ mm} \cdot 1,5\text{ mm}$ bestrahlt wurden. Diese Größe entsprach einem mittleren Volumen von nur $1,61\text{ mm}^3$. Weitere Aspekte sind der Reifegrad sowie die Wachstumsphase der Tumoren zum Bestrahlungszeitpunkt. Jeder Maus wurden nur etwa 3 – 5 μl einer Zellsuspension bestehend aus 10^5 Zellen pro 50 μl injiziert, was einer ungefähren Zellzahl von 10^4 Zellen pro Injektion entsprach. Der Grund hierfür war die Beobachtung aus Dresden, dass hohe Volumina zum Teil ein Abrutschen der Tumorzellsuspension an die Ohrbasis bedingten, was die Bestrahlung erschwerte beziehungsweise sogar verhindert hätte. Diese, im Vergleich zu den Dresdener Studien, um den Faktor zehn geringere Zellzahl könnte jedoch zu einer initialen Wachstumsverlangsamung geführt haben. Hierfür spräche, dass die Tumoren in den Versuchen der Forscher*innen aus Dresden zwei bis 20 Tage nach der Injektion sichtbar wurden und die durchschnittliche Zeitspanne von der Injektion bis zur Bestrahlung $14,5 \pm 0,8$ Tage betrug (Oppelt et al., 2015 und Beyreuther et al., 2017). Wohingegen es in dieser Arbeit zwischen drei und 28 Tagen dauerte, ehe die Tumoren nach der Injektion sichtbar wurden und die Zeit zwischen dem Injizieren und dem Bestrahlen der Tumorzellen bei durchschnittlich $19,6 \pm 7,0$ Tagen lag. Zum einen spricht die deutlich größere Standardabweichung der vorliegenden Daten für ein instabileres Tumormodell mit sehr heterogenem Wachstumsverhalten. Zum anderen erweckt

die Tumorverdopplungszeit der Kontrollgruppe von etwa 5,8 Tagen, welche sowohl im Vergleich zu den Dresdener Studien (TD = 2 – 4 Tage) als auch verglichen mit der Pilotstudie für dieses Projekt (TD ~ 2,8 Tage) verlängert war, den Eindruck eines abweichenden Wachstumsmusters der FaDu-Tumoren. Da das durchschnittliche Tumolvolumen zum Zeitpunkt der Bestrahlung in dieser Studie um den Faktor sechs kleiner war als das innerhalb der Versuche in Dresden und sich die Zeitspanne zwischen Injektion und Bestrahlung dennoch um etwa fünf Tage verlängert zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass sich das initiale Wachstum für einige Tumoren um mehr als zehn Tage verzögert haben könnte. So ist es möglich, dass einige der Neoplasien bereits im Stadium von Zellnestern eingebettet in Matrigel bestrahlt wurden, in dem noch kein exponentielles Wachstum eines soliden Tumors vorlag. Es ist vorstellbar, dass aus diesem Grund teilweise nur wenige bis keine Tumorzellen im Strahlengang der Mikrokanäle gelegen haben könnten. Dies hätte dazu geführt, dass die Peak-Dosis größtenteils an Bereiche abgegeben wurde, in denen sich nur Matrigel befand. Ein antitumoraler Effekt durch einen direkten Zellschaden wäre somit ausgeblieben beziehungsweise zumindest stark abgeschwächt worden. Zudem könnte ein noch unfertiges Tumorstroma ohne vollständig ausgebildetes Gefäßnetz zur Folge gehabt haben, dass der vaskuläre Effekt der MRT eventuell nicht zum Tragen kommen konnte. Diese bevorzugte destruktive Wirkung der Röntgen-Mikrokanäle auf die vaskulären Netze von Tumoren und deren unzulängliche Reparaturantwort konnte in mehreren Studien jedoch als wichtiger Faktor für die tumorablative Wirkung der MRT beobachtet werden (Bouchet et al., 2010 und Dilmanian et al., 2002). Dieses Phänomen hätte vermutlich einige jedoch nicht alle der behandelten Tumoren betroffen. Zudem wurde zusätzlich zu der Wirkung auf die Gefäße auch ein direkter zytoreduktiver Effekt der MRT beschrieben (Serduc et al., 2008), welcher auch auf Tumorzellnestern, beziehungsweise Tumorzellen vor Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase, einen Einfluss gehabt hätte. Diese Tatsachen könnten erklären, warum in der *proof of principle*-Studie, welche zuvor methodisch ident mit je einer Maus pro Versuchsgruppe an der MuCLS durchgeführt wurde, für jede Bestrahlung eine Wachstumsverzögerung beobachtet werden konnte (Dombrowsky et al., 2020). In dieser wuchs der Kontrolltumor mit 21 Tagen um zwei Tage schneller auf sein fünfzehnfaches Volumen heran als die Tumoren der Kontrollgruppe in der vorliegenden Analyse, welche durchschnittlich 23 Tage benötigten. Zwischen den mittels MRT mit 3 Gy bestrahlten Tumoren fand sich mit jeweils etwa 24 Tagen kein Unterschied. Alle anderen Versuchsgruppen dieser Arbeit wichen allerdings deutlich von den Tumoren der *proof of principle*-Studie ab. Deren Wachstum zeigte sich nach einer homogenen Bestrahlung mit 3 Gy um 9 Tage verzögert, nach einer 5 Gy MRT um 13,5 Tage

und nach einer homogenen Bestrahlung mit 5 Gy um sogar 16,5 Tage. Vergleicht man diese Daten allerdings mit den Tumoren dieser Studie, deren Wachstum sichtbar verlangsamt war, sprich welche 30 Tage oder länger benötigten, um ihr fünfzehnfaches Volumen zu erreichen, so käme man mit einer Verzögerung von jeweils etwa 9,5 Tagen für beide mit 3 Gy bestrahlten Gruppen, sowie von 11,8 Tagen für die 5 Gy MRT-Gruppe und von 15,7 Tagen für die 5 Gy homogen-Gruppe zu einem ähnlichen Ergebnis.

Die eher geringe Stichprobenanzahl dieser Arbeit von vier bis sieben Tumoren pro Gruppe bedingte, dass schon wenige Tumoren mit einem abweichenden Wachstumsverhalten zu einer hohen Streuung der Daten führen konnten, welche ein statistisch signifikantes Ergebnis generell unwahrscheinlicher macht. Die Heterogenität der Kontrollgruppe, welche sowohl „scheinbestrahlte“ als auch unbestrahlte Tumoren umfasste, dürfte hingegen keinen Einfluss auf das Ergebnis gehabt haben, da Beyreuther et al. (2017) zeigen konnten, dass sich das Tumorstadium nach einer „Scheinbehandlung“ nicht von demjenigen von unbehandelten Kontrollen unterschied und sich die Prozedur der Bestrahlung somit nicht auf diese auswirkte. Somit wäre es interessant, die Versuche mit einem stabileren Tumormodell und einem größeren Bestrahlungsfeld zu wiederholen, um die hier aufgestellte Hypothese, der initialen Wachstumsverlangsamung und vorzeitigen Bestrahlung zu überprüfen.

Ein wichtiger Punkt, welcher das heterotope Tumor-Ohr-Modell in Nacktmäusen von vielen vorausgegangenen Studien zum tumorablativen Effekt von Röntgen-Mikrokanälen unterscheidet, ist die Immundefizienz der Versuchstiere. In den meisten Versuchen zur MRT wurden orthotope Tumormodelle der Ratte genutzt, welche im Gegensatz zu der thymusaplastischen Nacktmaus eine intakte zelluläre Immunantwort mit funktionellen T-Lymphozyten aufweist. Bouchet et al. (2013) konnten zeigen, dass die frühe Antwort eines mit Röntgen-Mikrokanälen bestrahlten Gewebes hauptsächlich auf einer immunogenen und inflammatorischen Reaktion beruhte, welche durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Lymphokine reguliert wurde. Zusätzlich zu einer direkt zytotoxischen Wirkung schien eine durch die ionisierenden Strahlen veränderte Genexpression eine wichtige Rolle zu spielen, welche in über der Hälfte der Fälle zu einer Aktivierung von pro-inflammatorischen und immunstimulierenden Signalwegen führte und eine vermehrte Zellmigration, Antigenpräsentation und Zell-Zell-Kommunikation zur Folge hatte. Eine andere Studie, welche die MRT mit einer Immunoprophylaxe mittels Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) kombinierte, konnte beobachten, dass diese Stimulation des Immunsystems zu einer höheren Anzahl an Langzeitüberlebenden unter den Versuchstieren führte. Es wurde angenommen, dass diese Wirkung hauptsächlich durch die γ -Interferon-

Produktion von CD8⁺ T-Lymphozyten vermittelt wurde, welche zu einer Zerstörung der nach der Strahlentherapie persistierenden Tumorzellen geführt haben könnte (Smilowitz et al., 2016). Diese T-Zell-vermittelte immunogene Verstärkung des antitumoralen Effektes der MRT kann in präklinischen Modellen mit heteroptopen humanen Tumorzellen nicht zum Tragen kommen und könnte zu einer weniger starken Wirkung der Radiotherapie, besonders auch in Hinblick auf das Langzeitüberleben der Versuchstiere, führen. Dies würde den Vergleich mit den vorausgegangenen Studien an orthotopen Tumoren erschweren. So führte eine Studie an 9L-Gliosarkomen, die in Nacktmäuse implantiert wurden, verglichen mit den an Ratten durchgeführten Versuchen mit denselben Tumorzellen, zu einer deutlich geringeren Verlängerung des medianen Überlebens und zeigte keinen Hinweis auf einen hämodynamisch wirksamen vaskulären Effekt der Röntgen-Mikrostrahlen (Serduc et al., 2008). Die Autor*innen postulierten, dass diese unterschiedlichen Ergebnisse einerseits auf das spezielle Immunsystem der Nacktmäuse zurückzuführen sein könnten und andererseits auf die Parameter der Mikrokanalbestrahlung. Zu diesen zählen insbesondere die Peak- und Valley-Dosis, das PVDR, sowie die Breite und die Abstände der Mikrostrahlen, die Größe des bestrahlten Areal und die erreichte Dosisrate. Alle diese Konfigurationen könnten, neben den oben beschriebenen Unsicherheiten des Tumor-Ohr-Modells, auch in der vorliegenden Studie einen Einfluss auf das Ausbleiben einer deutlichen Tumorwachstumsverzögerung nach der Bestrahlung mit Röntgen-Mikrokanälen gehabt haben.

Bestrahlungsparameter

Die Röntgen-Mikrokanalbestrahlung an der MuCLS erfolgte mit 50 µm breiten Mikrostrahlen, die einen Mittenabstand von 350 µm aufwiesen. Zehn von ihnen bildeten ein rundes Bestrahlungsareal mit einem Durchmesser von 2,3 mm, welches etwas größer war als die Tumoren, sodass diese einerseits vollständig bestrahlt werden konnten, andererseits jedoch auch ein gewisser Anteil an gesundem Gewebe von den ionisierenden Strahlen getroffen wurde. Mit einer Strahlenenergie von 25 keV und einer Dosisrate von 0,57 Gy /min wurden Peak-Dosen von entweder 21 Gy oder 35 Gy appliziert, wobei die Valley-Dosis jeweils unter 200 mGy lag.

Die meisten dieser Bestrahlungsparameter unterschieden sich deutlich von jenen aus den zuvor an großen Synchrotronanlagen durchgeführten Studien. Den augenfälligsten Unterschied stellen hierbei die applizierten Peak-Dosen dar, welche in den an Synchrotrons durchgeführten Studien zum antitumorigenen Effekt der MRT bei mehreren Hektogray lagen. Üblicherweise konnten Dosen zwischen 200 Gy und 500 Gy zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums

und einem verlängerten Überleben der Versuchstiere führen (Dilmanian et al., 2002, Serduc et al., 2008, Serduc et al., 2009, Bouchet et al., 2010, Crosbie et al., 2010, Bouchet et al., 2013 und Bouchet et al., 2016b). Es konnte gezeigt werden, dass die Höhe der Peak-Dosis, bei einer konstant gehaltenen Valley-Dosis, sowohl die Tumorantwort als auch die Toxizität im Normalgewebe deutlich beeinflusste (Serduc et al., 2009). Unter anderem wird hierbei der direkte Zellschaden im Strahlengang, durch die Induktion von Apoptose, für den antitumorigenen Effekt verantwortlich gemacht. Ibahim et al. (2014) konnten feststellen, dass unterschiedliche Zelllinien *in vitro* jeweils charakteristische Dosis-Wirkungs-Profile aufwiesen. Für EMT6,5ch-Zellen entsprach beispielsweise eine Peak-Dosis von 112 Gy, welche mittels 25 µm breiten Mikrostrahlen im Abstand von 200 µm (PVDR ~ 75) appliziert wurde, einer homogen applizierten Dosis von etwa 5,0 Gy. Zudem wurde ein vaskulärer Schaden der MRT, in immaturren und tumoralen Gefäßnetzen, bisher bei Peak-Dosen von ≥ 150 Gy beschrieben (Griffin et al., 2012 und Bouchet et al., 2015). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Peak-Dosen waren wesentlich niedriger. Sie könnten demnach zu gering gewesen zu sein, um einen wirksamen antitumorigenen Effekt durch direkte Strahlenschäden zu induzieren. Auch die über die insgesamt bestrahlte Fläche integrierte Gesamtdosis war mit 3 Gy beziehungsweise 5 Gy sehr gering. In einer Studie zum gewebeschonenden Effekt der MRT konnte gezeigt werden, dass die vom normalen Gewebe tolerierte integrierte Dosis im Vergleich zu einer konventionell homogen applizierten Dosis um den Faktor 4,2 höher lag (Dilmanian et al., 2002). Folgt man diesem Ergebnis, so könnte man vermuten, dass die mittels MRT applizierten Gesamtdosen in der vorliegenden Arbeit viel höher hätten ausfallen können. Um einen mit den homogen applizierten Dosen von 3 Gy und 5 Gy vergleichbaren Effekt zu erzielen, hätten für die über das Bestrahlungsfeld integrierten MRT-Dosen vermutlich etwa 12 Gy und 20 Gy gewählt werden können. Einen weiteren Aspekt, neben der Bestrahlungsdosis, stellt die Dosisverteilung dar. Die Breite der in dieser Arbeit eingesetzten Strahlen entsprach in etwa derjenigen, welche auch in den meisten anderen Versuchsreihen eingesetzt wurden. Diese lagen meist bei 25 µm (Dilmanian et al., 2002, Serduc et al., 2008 und Crosbie et al., 2010) oder bei 50 µm (Serduc et al., 2009, Bouchet et al., 2010, Bouchet et al., 2013 und Bouchet et al., 2016b). Allerdings ließ sich durch einen Vergleich dieser Studien in Hinblick auf die Relation von Breite und Abstand der Mikrostrahlen zusätzlich vermuten, dass ein niedrigeres Verhältnis von etwa 1 : 4 bessere Ergebnisse in Hinblick auf den antitumorigenen Effekt zeigen konnte, als höhere. Dieses Verhältnis war bei den Bestrahlungen an der MuCLS mit 1 : 7 deutlich höher und könnte einen durch die niedrigen Peak-Dosen eventuell schon geringen antitumorigenen Effekt möglicherweise noch weiter abgeschwächt

haben. Grund dieser abweichenden Relation von Mikrostrahlbreite und -abstand war der mit 350 μm eher große Mittenabstand der an der MuCLS generierten Mikrostrahlen. Die meisten vorausgehenden Studien mit Synchrotronstrahlung verwendeten Mikrostrahlen mit Mittenabständen von etwa 200 μm (Serduc et al., 2008, Serduc et al., 2009, Bouchet et al., 2010, Crosbie et al., 2010, Bouchet et al., 2013 und Bouchet et al., 2016b), seltener mit noch geringeren Abständen von 100 μm oder sogar 75 μm (Dilmanian et al., 2002). Den Abständen der Mikrokanäle kommt jedoch eine besondere Bedeutung zu. Es konnte gezeigt werden, dass ihre Größe proportional zum gewebeschonenden und umgekehrt proportional zum antitumorigenen Effekt der MRT ist (Regnard et al., 2008). Dies kann unter anderem dadurch erklärt werden, dass eine Verkleinerung der Abstände zwischen den Mikrokanälen die Valley-Dosis erhöht und damit die Gewebetoxizität steigert (Dilmanian et al., 2002). So ist es vorstellbar, dass diese intensivere Hintergrundstrahlung die antitumorigene Wirkung zumindest teilweise bedingt (Uyama et al., 2011). Die Valley-Dosis scheint also die kritische Größe für die Balance zwischen einer wirksamen Tumorkontrolle und einer ausreichenden Gewebeschonung zu sein. Für schmale Abstände $\leq 100 \mu\text{m}$ konnten Dilmanian et al. (2002) eine Valley-Dosis von $\leq 19 \text{ Gy}$ als tolerable Dosis festlegen, welche dennoch zu einem deutlichen Überlebensvorteil führte. Die bei den Bestrahlungen an der MuCLS entstandene Dosis in den Valley-Regionen lag im Vergleich hierzu bei $< 200 \text{ mGy}$, was zwar für eine gute Toleranz im normalen Gewebe sprechen würde, für eine Tumorstillstandverzögerung allerdings zu gering gewesen sein könnte. Denn der Valley-Region wird auch in Hinblick auf strahleninduzierte Bystander-Effekte eine große Bedeutung beigemessen. Diese könnten ebenfalls einen wichtigen Beitrag zur antitumorigenen Wirkung der MRT leisten. Es wurde vermutet, dass sie zu einer gestörten funktionellen Gewebeintegrität und einer geringeren Zell-Proliferationsrate in den zwischen den Strahlengängen gelegenen Arealen beitragen. Nicht nur die applizierte Gesamtdosis, sondern auch das Verhältnis und die Art der räumlichen Aufteilung der Dosisbereiche schienen für diesen Mechanismus eine wichtige Rolle zu spielen (Bräuer-Krisch et al., 2005 und Uyama et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass ein geringes PVDR, welches durch ähnlich hohe Peak- und Valley-Dosen charakterisiert ist, einen starken antitumorigenen Effekt aufwies, wohingegen große PVDR eine gute Gewebetoleranz bedingten (Bräuer-Krisch et al., 2005). Die meisten Studien, welche eine deutliche Wachstumsverzögerung der mittels MRT behandelten Tumoren oder ein verbessertes Überleben der Versuchstiere beobachten konnten, berichteten ein PVDR zwischen 10,5 und 33. Das PVDR der Röntgen-Mikrostrahlung an der MuCLS lag hingegen bei etwa 200 und könnte somit zu hoch für eine therapeutische Wirkung der MRT gewesen sein. Zusätzlich zum PVDR

konnte auch der laterale Dosisabfall innerhalb der sogenannten Transitionszone als wichtiger Faktor sowohl für die Gewebetoleranz als auch für die Tumorkontrolle der MRT identifiziert werden. Dieser wird durch die Breite der Mikrokanäle und ihre Abstände zueinander sowie durch die Größe des Bestrahlungsfeldes bedingt (Siegbahn et al., 2006). Wie zuvor in der Einleitung erwähnt, konnte eine Studie an der ESRF mit Mikrokanalstrahlung, welche eine mittlere Energie von 120 keV aufwies, zeigen, dass die Dosis lateral des Peaks auf einer Strecke von 9 μm von 80 % auf 20 % abfiel, was ungefähr der Größenordnung einer Zelle entspricht. Weitere 20 μm weiter lateral wurden noch etwa 5 % der applizierten Peak-Dosis, in diesem Fall 15 Gy, an das Gewebe abgegeben und weitere 30 μm von dort waren es noch 2 %. Die Autor*innen stellten daraufhin fest, dass dieser Dosisabfall auf einer Strecke geschah, welche innerhalb des Umfangs der Zellsignalisierung lag. Sie vermuteten, dass die strahleninduzierten Bystander-Effekte von Zellen ausgehen, die mit mindestens 5 – 10 Gy bestrahlt wurden und sogar gegebenenfalls direkt von den mit mehreren Hektogray getroffenen Zellen im Zentrum des Strahls ausgehen könnten (Dilmanian et al., 2007). Bedingt durch die niedrigere Strahlenenergie von 25 keV war die Transitionszone der an der MuCLS generierten Mikrostrahlen im Vergleich hierzu mit insgesamt $< 20 \mu\text{m}$ viel schmaler und der Abfall der Dosis dementsprechend viel steiler (Burger et al., 2017). Hierdurch könnte es zu einem höheren Überleben von Tumorzellen außerhalb der Mikrokanäle und somit ebenfalls zu einem weitaus schwächeren antitumorigenen Effekt gekommen sein. Eine zusätzliche Rolle könnten hierbei auch die verwendeten FaDu-Zellen selber gespielt haben. Mothersill et al. (2011) konnten feststellen, dass einige Zellen, welche entweder wenig strahlensensibel waren oder aber ein mutiertes oder dysfunktionales p53 aufwiesen, keine Zelltod-induzierenden Bystander-Signale aussendeten. Genetische Analysen von FaDu-Zellen zeigten ausschließlich mutiertes p53-Protein, welches auf einer *missens*-Mutation des Codons 248 mit einer Transversion von G zu T basierte. Die p53-RNA war um 50 % reduziert, da nur eines der zwei Allele transkribiert wurde (Reiss et al., 1992). Somit stellt sich die Frage, ob ein Bystander-Effekt in diesem präklinischen Tumormodell, beziehungsweise in der klinischen Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren, genauso stark zum Tragen kommen könnte, wie in der Therapie anderer Tumorentitäten. Einen letzten wichtigen Unterschied innerhalb der Bestrahlungsparameter stellt die sehr geringe Dosisrate der an der MuCLS generierten Strahlung dar. Sie lag mit etwa 0,01 Gy /s deutlich unterhalb der Dosisraten, welche an großen Synchrotronanlagen erreicht werden können. Die meisten hier zitierten Studien berichteten Dosisraten zwischen mehreren hundert und bis zu 16.000 Gy /s. Es wurde gezeigt, dass das Protrahieren einer festgelegten Dosis durch niedrige Dosisraten zu einem Verlust der biologischen Effektivität führen konnte.

Dieses Phänomen fand in einer Zunahme des klonogenen Zellüberlebens und einer Abnahme der Gewebetoxizität der Strahlung Ausdruck (Bedford & Mitchell, 1973).

Zusammenfassend könnten sich folglich mehrere Aspekte der Bestrahlungsparameter dieser Arbeit negativ auf den antitumorigenen Effekt der an der MuCLS erzeugten Röntgen-Mikrostrahlen ausgewirkt haben. Zunächst waren die gewählten Dosen vermutlich zu niedrig, um einen Effekt zu erzielen, der sich mit dem der homogenen Bestrahlungen vergleichen ließe. Weiters könnten zusätzlich der steile laterale Dosisabfall im Gewebe sowie die niedrige Dosisrate und auch der p53-Status der FaDu-Zellen zu einer weiteren Abschwächung der antitumorigenen Wirkung der Bestrahlung geführt haben. Weitere Eigenschaften von Kopf-Hals-Tumorzellen werden im Folgenden mit Hinblick auf die Herausforderungen in der Radiotherapie näher beleuchtet.

Lokale Tumorkontrolle von Kopf-Hals-Tumoren durch Radiotherapie

Plattenepithel-Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches (*head and neck squamous cell carcinomas*, HNSCC) weisen generell eine hohe genomische Instabilität auf. Durchschnittlich konnten 141 Veränderungen der Genkopienanzahl und 62 chromosomale Aberrationen pro Tumor beobachtet werden. Strukturelle Chromosomenaberrationen waren häufig assoziiert mit *loss-of-function*-Mutationen von Tumorsuppressorgenen (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Es konnte gezeigt werden, dass die in der Forschung etablierten Zelllinien aus humanen HNSCC viele der Genmutationen widerspiegeln, welche auch in menschlichen Kopf-Hals-Tumoren häufig beobachtet werden konnten. Somit dürften sie im Allgemeinen adäquate Modelle für die Therapie dieser Karzinome darstellen (Li et al., 2014). Zu den am häufigsten vorkommenden genetischen Veränderungen zählten eine *loss-of-function*-Mutation des TP53-Tumorsuppressorgens, welche zu einer ungehemmten Proliferation der betroffenen Zellen führte. Beispielsweise konnten Somers et al. (1992) in 13 der 13 von ihnen analysierten HNSCC-Zelllinien, darunter auch FaDu-Zellen, Mutationen des p53-Gens nachweisen. Sieben von ihnen entsprachen einer *missens*-Mutation mit Transversion der Base G zu T, von denen fünf die Codons 245 oder 248 betrafen. Die Autor*innen nahmen an, dass dieser Genlocus eine kritische Stelle für in Tabakrauch beinhaltete Karzinogene darstellte. Auch Li et al. (2014) fanden in 64,2 % der von ihnen analysierten humanen HNSCC und in 84,6 % der untersuchten Zelllinien ein mutiertes TP53. Wie zuvor beschrieben könnte diese Voraussetzung durch einen zumindest schwächeren Bystander-Effekt den antitumorigenen Effekt einer MRT auf Kopf-Hals-Tumoren einschränken. Eine weitere häufig beobachtete genetische Veränderung vieler HNSCC stellte eine Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) dar,

welche zum einen durch Genamplifikation und zum anderen durch die Aktivierung der Transkription bedingt wurde. Zugrunde lagen verschiedene Genmutationen des EGFR-Signalwegs, welche sowohl zur Tumorentstehung als auch zum weiteren Tumorwachstum beitragen konnten. Es konnte gezeigt werden, dass diese unter Kopf-Hals-Tumoren verbreiteten Mutationen eine Herausforderung in ihrer radiotherapeutischen Therapie darstellen können. Während der zeitlich fraktionierten Radiotherapie, welche derzeit das strahlentherapeutische Standardverfahren für HNSCC darstellt, konnte ein verändertes Wachstumsverhalten der Malignome beobachtet werden, welches durch ein etwa drei Wochen nach Beginn der Bestrahlung einsetzendes beschleunigtes Tumorwachstum gekennzeichnet wurde. Für den zugrunde liegenden Mechanismus dieses sogenannten Zeitfaktors konnte hauptsächlich eine Zunahme des Anteils an proliferierenden Tumorzellen verantwortlich gemacht werden. Immunhistochemisch zeigte sich eine verstärkte Expression des EGFR. Diese akzelerierte Proliferation konnte mit einer wiedereinsetzenden verbesserten Oxygenierung des Tumors, etwa zwölf Tage nach Beginn der Radiotherapie, in Verbindung gebracht werden (Petersen et al., 2003). Das Phänomen führte in der Praxis dazu, dass die für die weitere Tumorkontrolle benötigte Dosis mit der Zunahme der Behandlungsdauer anstieg (Baumann et al., 1994). Diese Abnahme der biologischen Effektivität konnte auf eine Reparatur subletaler Schäden während der prolongierten Behandlungszeit zurückgeführt werden (Withers et al. 1988b). Petersen et al. (2003) konnten zeigen, dass die initiale Zunahme an hypoxischen Bereichen der Tumoren auf eine verminderte Durchblutung bei jedoch intaktem Gefäßnetz beruhte. Eine MRT könnte diesem Phänomen durch ihre antiangiogenen Effekte sowie auch durch die Möglichkeit einer einzeitigen Bestrahlung entgegenwirken und somit eine bessere Tumorkontrolle für Kopf-Hals-Tumoren erreichen.

Auf zellulärer Ebene konnten hypoxische Bedingungen ebenfalls mit einer erhöhten Strahlenresistenz in Verbindung gebracht werden (Hall et al., 2003). Eine mögliche Erklärung wäre der hypoxie-bedingte Übergang der betroffenen Zellen in die G₀-Phase des Zellzyklus, in der diese strahlenresistenter wären (Petersen et al., 2003). Zwei Faktoren könnten auch in der Tumorstadiumsanalyse der vorliegenden Arbeit zu hypoxischen Verhältnissen in den FaDu-Tumoren geführt haben. Einerseits würde eine noch nicht abgeschlossene Neoangiogenese der Tumoren zum Zeitpunkt der Bestrahlung zu einer instabileren Sauerstoffversorgung führen, was wie oben beschrieben für einige Tumoren der Fall gewesen sein könnte. Andererseits könnten auch die langen Bestrahlungszeiten, welche besonders für die Dosisapplikation mittels Mikrokanälen benötigt wurden, zu einer Kreislaufdepression mit einer Sauerstoffminderversorgung geführt haben. Diese hätte speziell die Akren und damit auch die

tumortragenden Ohren der Versuchstiere betroffen. Da die Dauer der Bestrahlung mittels MRT bis zu zehnmal mehr Zeit in Anspruch nehmen konnte als die Applikation der homogenen Dosen, könnte eine hypoxie-bedingte Strahlenresistenz den Vergleich der Wirksamkeit beider Bestrahlungsmethoden verzerrt haben. In Zusammenschau mit den oben bereits diskutierten Effekten der gewählten Bestrahlungsparameter könnte besonders eine Erhöhung der an der MuCLS erreichbaren Dosisrate bessere Voraussetzungen für weitere *in vivo* Studien zum antitumorigenen Effekt der MRT schaffen.

Trotz dem diskutierten Verbesserungspotenzial konnte mit dem hier durchgeführten Experiment ein Set-up für weitere *in vivo* Bestrahlungen mit Röntgen-Mikrokanälen an der MuCLS etabliert werden. Dies stellt einen wichtigen Schritt für die unabhängige Erforschung dieser Technik und ihre Translation in den klinischen Anwendungsbereich dar. Im nächsten Abschnitt werden die bisher innerhalb der MRT-Forschung erzielten Ergebnisse an anderen alternativen Strahlenquellen beleuchtet.

MRT Studien an kompakten Strahlenquellen

Aktuell gibt es viele Projekte, welche an der Entwicklung von kompakten Strahlenquellen arbeiten, um Alternativen zu den großen Synchrotronanlagen zu schaffen. Besonders auf dem Gebiet der auf dem Konzept der ICS basierenden CLS existieren international viele Projekte. LINAC-basierte Konzepte beinhalten unter anderem die *Tsinghua Thomson Scattering X-ray Source* am *Accelerator Laboratory* der *Tsinghua University* in Beijing (China) (Rui & Huang, 2018), das STAR-Projekt der Universität von Kalabrien (Italien) (Bacci et al., 2016) sowie die CLS der *High Energy Accelerator Research Organization* (KEK) in Japan (Sakanaka et al., 2015). Ein weiteres vielversprechendes Projekt, welches wie die MuCLS auf einem Mini-Synchrotron basiert, ist das ThomX-Projekt an der *Université Paris-Sud XI* (Frankreich) (Variola, 2011). Alle genannten kompakten Strahlenquellen befinden sich derzeit allerdings noch im Aufbau. Der Zeitplan des ThomX-Projektes sah vor, die ersten Röntgenstrahlen Ende 2019 zu erzeugen (Dupraz & Amoudry, 2019). Dementsprechend liegen aktuell noch keine Daten aus präklinischen Bestrahlungsstudien vor. Die Leistung der französischen ICS-Strahlenquelle entspräche allerdings in etwa derjenigen der MuCLS. Für eine stereotaktische Bestrahlung würden eine Energie von etwa 80 keV, ein Photonenfluss von $3 \cdot 10^{12}$ Photonen /s sowie eine maximale Dosisrate von ca. 48 mGy /s erwartet. Um eine Dosis zwischen 10 Gy und 20 Gy zu applizieren, wären also Bestrahlungszeiten von etwa 5 – 10 min notwendig (Variola et al., 2014).

An Bestrahlungseinheiten basierend auf Röntgenröhren konnten hingegen bereits erfolgreich *in vitro* Versuche mit Pankreas-Zellen (Panc1) durchgeführt werden. Die hier erzeugten Mikrostrahlen hatten eine Größe von 50 μm sowie einen Mittenabstand von 400 μm und lagen damit in der Größenordnung der an der MuCLS erzeugten Mikrokanäle. An ihnen wurde eine Dosisrate von 300 mGy/s erreicht, sodass es möglich war Peak-Dosen von 80 Gy in etwa 5,75 min zu applizieren. Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass der entstehende Zellschaden fast exakt dem Strahlenverlauf der Mikrokanäle entsprach. Die Penumbra-Region war mit einer Breite von 90 μm allerdings größer als bei vergleichend durchgeführten Bestrahlungen mit ähnlicher Konfiguration an der ESRF (Bartzsch et al., 2016). Mittels Monte Carlo-Simulationen konnten Bartzsch und Oelfke (2017) zeigen, dass eine Röntgenröhre mit Linienfokus die Brillanz der Strahlung, im Vergleich zu der bis jetzt eingesetzten konventionellen Röntgenröhre, um mehr als zwei Größenordnungen steigern könnte. Das Konzept einer solchen Röntgen-Mikrostrahlenquelle verspräche eine maximal erreichbare Dosisrate von 180 Gy/s. Im Hinblick auf die für eine MRT möglichen Peak-Dosen wäre diese den ICS-Strahlenquellen also überlegen. Allerdings würden die mittels LFXT erzeugten Mikrokanäle noch immer eine höhere Divergenz mit einer Zunahme der Mittenabstände in größerer Distanz vom Kollimator aufweisen. In 20 cm Entfernung würde die Penumbra bis zu 4 % des Strahlenabstands betragen (Bartzsch & Oelfke, 2017).

Bis jetzt ließ der Aufbau dieser auf Röntgenröhren basierten Mikrostrahlenquellen nur *in vitro* Studien zu. Die ersten Ergebnisse zu *in vivo* MRT-Bestrahlungen liegen von Experimenten an der auf CNT-Feldemissionstechnologie basierenden kompakten Röntgen-Mikrokanal-Bestrahlungseinheit der *University of North Carolina* vor. Yuan et al. (2015) konnten erfolgreich eine Studie zur MRT von humanen Glioblastomen im Mausmodell durchführen. Die Bestrahlungen erfolgten bildgesteuert, sodass die Röntgen-Mikrostrahlen präzise an das Zielvolumen abgegeben werden konnten. Die eingesetzten Mikrokanäle waren mit 280 μm vergleichsweise breit und besaßen einen Abstand von 900 μm zueinander. Das Verhältnis zwischen Breite und Abstand der Strahlen entsprach dem Verhältnis, welches für die meisten Studien zum antitumorigenen Effekt an der ESRF eingesetzt wurde. Die applizierten Peak-Dosen betragen jeweils 48 Gy oder 72 Gy und es konnte ein mittleres PVDR von 15 erreicht werden. Mit dieser Behandlung konnte sowohl ein signifikant verzögertes Tumorwachstum als auch ein verlängertes Überleben der Versuchstiere im Vergleich zu einer „schein-bestrahlten“ Versuchsgruppe beobachtet werden. Die mittlere Überlebenszeit verlängerte sich durch die niedrigere MRT-Dosis um etwa 11 Tage (31,4 %) und durch die höhere um etwa 17 Tage (48,5 %). Dieses Ergebnis war vergleichbar mit dem Effekt einer homogenen Bestrahlung mit

10 Gy. Gleichzeitig zu dieser antitumorigenen Wirkung, konnten die Autor*innen eine gute Toleranz des normalen Hirngewebes gegenüber der MRT beobachten. Der DNA-Schaden und die Apoptoserate waren hier deutlich geringer als im Tumorgewebe. Außerdem zeigte sich eine gesteigerte Zellproliferation, die ebenfalls höher war als in homogen bestrahltem Gewebe, was als eine schnellere Geweberegeneration nach einer MRT gedeutet wurde. Die Studie konnte weiters eine hohe migratorische Aktivität innerhalb des Tumorgewebes beobachten, welche durch eine Ausbreitung des γ -H2AX-Signals zum Ausdruck kam und dem von Crosbie et al. (2010) beschriebenen Waschmaschinen-Effekt nach synchrotron-generierter MRT gleichkam. Es ließ sich also feststellen, dass eine an einer kompakten CNT-basierten Strahlenquelle erzeugte MRT ähnliche Effekte auf sowohl neoplastisches als auch normales Gewebe zeigten konnte, wie synchrotron-generierte Röntgen-Mikrokanäle. Ähnlich wie an der auf ICS-basierenden kompakten Strahlenquelle ist allerdings auch an der CNT-basierten Bestrahlungseinheit die relativ geringe Dosisrate von 1,2 Gy/min der hauptsächlich limitierende Faktor, um hohe Dosen applizieren zu können. Trotz der abweichenden Dosisverteilung mit deutlich breiteren Mikrostrahlen und geringeren Peak-Dosen fanden sich allerdings Gemeinsamkeiten der Studienparameter mit denen aus den Versuchen zum antitumorigenen Effekt an großen Synchrotronanlagen. Sowohl das Verhältnis von Mikrostrahlbreite und -abstand mit etwa 1 : 3 als auch das PVDR mit 15 lagen in derselben Größenordnung. Dies könnte dafürsprechen, dass diese Variablen besonders kritische Faktoren für die Wirksamkeit der MRT darstellen. Eine Anpassung dieser könnte vermutlich auch an der MuCLS zu vergleichbareren Ergebnissen führen.

Mit der MuCLS durchgeführte in vitro Experimente ließen bereits einen gewebeschonenden Effekt der hier erzeugten Röntgen-Mikrostrahlen im Vergleich zu einer homogenen Bestrahlung beobachten (Burger et al., 2017). Die vorliegende Arbeit untersuchte hieran anknüpfend den antitumoralen Effekt in vivo. Die zum jetzigen Zeitpunkt noch limitierte Anzahl präklinischer in vivo Experimente zur Röntgen-Mikrokanalbestrahlung an kompakten Strahlenquellen verdeutlicht das große Potenzial der MuCLS auf diesem Gebiet. Die in dieser Arbeit entstandenen Ergebnisse zur Tumorkontrolle und zu zellulären Veränderungen bedeuten einen wichtigen Schritt für die Translation der MRT.

Die größten Limitierungen der auf ICS basierenden CLS stellen weiterhin die niedrige Photonenenergie und Dosisrate sowie die geringe Feldgröße dar. An der MuCLS wird bereits intensiv an einer Optimierung dieser Faktoren gearbeitet. Anpassungen am Design des Elektronenspeicherrings und der Elektroneneinspeisung könnten es möglich machen die Energie der an der MuCLS generierten Röntgenstrahlen auf eine klinisch relevante Höhe von

≥ 200 keV anzuheben und somit die Eindringtiefe der Strahlung zu steigern (Burger et al., 2017). Zusätzliche Verbesserungen des Lasersystems konnten bei einer Energie von 35 keV bereits zu einem gesteigerten Photonenfluss von maximal $5 \cdot 10^{10}$ Photonen /s führen (Günther et al., 2020). Diese Entwicklungen haben zum Ziel die Dosisrate zu erhöhen und somit die Bestrahlungsdauer künftig zu reduzieren (Eggl et al., 2016). Unter Strahlkollimation konnten bei einer Energie von 25 keV bereits maximale Dosisraten von bis zu 5,3 Gy /min erreicht werden. Es scheint somit möglich deutlich höhere Peak-Dosen von bis zu 100 Gy zu applizieren. Für ein größeres Bestrahlungsfeld mit einem Durchmesser von etwa 3,5 mm stünde außerdem eine zweite Polykapillaroptik zur Verfügung (Burger et al., 2020).

Vor diesem Hintergrund erscheint es nicht nur möglich sondern auch sinnvoll weitere Studien zur Wachstumsverzögerung von FaDu-Tumoren mit einem angepassten Studiendesign durchzuführen. Um sicher zu stellen, dass die Behandlung in einem Stadium stattfindet, indem schon ein solider Tumor mit ausgebildetem Gefäßnetz und einem exponentiellen Wachstum besteht, sollten das Bestrahlungsfeld vergrößert und Tumoren erst ab einem Durchmesser von 3 mm bestrahlt werden. Weiters sollten auch die eingesetzten Dosen erhöht werden. Vorstellbar wären Peak-Dosen von ≥ 100 Gy sowie integrierte Dosen um 20 Gy mit einem deutlich niedrigeren PVDR. Zusätzlich wäre es interessant den Effekt des Verhältnisses von Mikrostrahlbreite und -abstand zu untersuchen. In der Folge wäre es einerseits möglich zu analysieren, ob der heterogene Effekt der Bestrahlungen in der vorliegenden Arbeit tatsächlich mit der kleinen Größe und einem deshalb unreifen Gefäßnetz im Zusammenhang steht. Andererseits könnte die Wirkung höherer Peak-Dosen und ihre Vergleichbarkeit mit den homogen applizierten Dosen von 3 Gy und 5 Gy untersucht werden. Mit diesen Daten würden die bereits gesammelten Ergebnisse zum antitumoralen Effekt der an der MuCLS erzeugten Röntgen-Mikrostrahlen auf Hypopharynx-Karzinomzellen sinnhaft ergänzt werden.

Trotz der nicht signifikanten Daten aus der Wachstumsanalyse stellt der hier durchgeführte Versuch einen wichtigen Schritt für die Implementierung der MRT an kompakten Strahlenquellen dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Erzeugung von Röntgen-Mikrostrahlen an der MuCLS möglich und eine Tumorbestrahlung im Mausohr-Modell durchführbar ist. In der Folge können nun mit deutlich weniger Aufwand, als es für die Studien an großen Synchrotronanlagen der Fall ist, weitere Versuche zur Wirkung und den Vorteilen einer MRT für verschiedene Tumorentitäten an der MuCLS durchgeführt werden. Damit ist es möglich, das Wissen über diese Bestrahlungsart schnell zu erweitern, um einen zukünftigen klinischen Einsatz von Mikrokanälen zu ermöglichen.

5.2 Strahlensensibilität

Während der Analyse des klonogenen Zellüberlebens wurden signifikante Abweichungen zwischen den 2017 und den 2018 erhobenen Daten festgestellt. Es zeigten sich für fast alle Versuchsgruppen sowohl Unterschiede der berechneten Ausplattierungseffizienzen als auch der dosispezifischen Überlebensfraktionen. Das klonogene Potential der Tumorzellen und ihre Proliferation schienen in der Versuchsreihe von 2018 für beide mit 3 Gy bestrahlten Gruppen, sowie für die Zellen, welche zuvor mit 5 Gy homogen bestrahlt worden waren, höher zu sein, als in den 2017 durchgeführten CFA. Im Mittel unterschieden sich ihre Ausplattierungseffizienzen zwischen beiden Datenreihen signifikant um 2,4 Prozentpunkte. Für diejenigen Zellen, welche eine MRT mit 5 Gy erhalten hatten, zeigte sich hingegen genau das Gegenteil. Ihre PE lag in den 2017 durchgeführten CFA mit ebenfalls 2,4 Prozentpunkten signifikant höher als in jenen, die 2018 nachgeholt wurden. Einzig die PE der Kontrollgruppe zeigte sich für beide Teilversuche vergleichbar. Auch die gruppenspezifischen Überlebensfraktionen beider Versuchsreihen wichen ab einer Dosis von 4 Gy signifikant voneinander ab. Für alle Versuchsgruppen, mit Ausnahme der 5 Gy MRT-Gruppe, waren die dosispezifischen SF nach einer Bestrahlung mit dem *Xstrahl* niedriger als nach der Bestrahlung mit dem *Gulmay*. Für diejenigen Zellen, welche eine MRT mit 5 Gy erhalten hatten, zeigten sich allerdings ähnliche Überlebensfraktionen für beide Versuchsreihen.

Trotz der nicht direkt vergleichbaren Datensätze ließen sich mehrere gemeinsame Beobachtungen formulieren. Das Zellüberleben beider homogen bestrahlter Gruppen war ab einer Testdosis von 2 Gy signifikant niedriger als das der Kontrolle. Ab einer Dosis von 4 Gy konnte dies auch für die 3 Gy MRT-Gruppe beobachtet werden. Innerhalb der Daten von 2018 lag die SF dieser Zellen nach der 8 Gy-Testdosis allerdings leicht, wenn auch nicht signifikant, überhalb derjenigen der Kontrolle. Für die 5 Gy MRT-Gruppe zeigte sich hingegen kein gemeinsamer Trend beider CFA-Versuchsreihen. Für die mit dem *Gulmay* bestrahlten Tests lag ihre SF nur für die 8 Gy-Dosis signifikant unterhalb derjenigen der Kontrolle und unterschied sich ansonsten nicht von ihr. Innerhalb der am *Xstrahl* bestrahlten CFA wies die 5 Gy MRT-Gruppe ab einer Testdosis von 4 Gy eine deutlich höhere SF als alle anderen Versuchsgruppen auf. Dieser Unterschied erwies sich jedoch als nicht signifikant. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch die Regressionsanalyse des Zellüberlebens. Es konnte, im Vergleich zu den Kontrollkurven, von niedrigeren dosisabhängigen Überlebensfraktionen für die beiden homogen bestrahlten Gruppen ausgegangen werden. Der Verlauf der Überlebenskurve der 3 Gy MRT-Gruppe lag für die Versuchsreihe 2017 ebenfalls unterhalb der Referenzkurve. Für die Daten aus 2018 wich sie allerdings nicht von dieser ab. Die größte Diskrepanz ergab sich

wiederum für diejenigen Zellen, welche eine MRT mit 5 Gy erhalten hatten. Ihre Überlebenskurve unterschied sich für die Daten, welche 2017 erhoben wurden, signifikant von derjenigen der Kontrolle und lag bei den höheren Testdosen unter dieser. Für die 2018 durchgeführten Koloniebildungstests, verlief sie jedoch oberhalb der Referenzkurve. Mit einem $p = .066$ war diese Abweichung nahezu statistisch signifikant.

Die, besonders die für die 5 Gy MRT-Gruppe, nicht stringenten Ergebnisse lassen eine sichere Beantwortung der Frage nach einer veränderten Strahlensensibilität durch Röntgen-Mikrokanalbestrahlungen nicht zu. Im Folgenden sollen mögliche Gründe für die Unterschiedlichkeit der gesammelten Daten sowie auch für das, von allen anderen Gruppen, abweichende Verhalten der mit einer 5 Gy MRT behandelten Zellen exploriert werden. Weiters wird auch das hier dokumentierte Zellüberleben der anderen Versuchsgruppen interpretiert und in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet.

Unterschiede beider CFA Versuchsreihen

Die Tatsache, dass sich die erhobenen Daten der beiden CFA-Versuchsreihen signifikant voneinander unterschieden, führte dazu, dass zwei Teilversuche mit einer jeweils geringen Stichprobenzahl ausgewertet wurden. Am stärksten betroffen war hiervon die Kontrollgruppe, von der für die Berechnungen von PE und SF nur jeweils eine Zelllinie für die erste Versuchsreihe, sowie zwei für die zweite Versuchsreihe zur Verfügung standen. In die Auswertung zum Zellüberleben konnten von diesen nur ein Koloniebildungstest für den Teilversuch 2017 beziehungsweise zwei für den Versuch 2018 eingeschlossen werden. Somit erscheint es unwahrscheinlich, dass ihre Gruppenmittelwerte als repräsentativ angesehen werden können. Auch die 5 Gy MRT-Gruppe wies mit nur zwei CFA im Teilversuch 2018 eine ähnlich kleine Größe auf. Für das klonogene Überleben aller anderen Versuchsgruppen konnten jeweils zwischen vier und zwölf CFA ausgewertet werden, die von drei bis sechs Zelllinien stammten (Tabellen 4.3 und 4.7). Neben diesen kleinen Gruppengrößen, die gemeinsam mit der teilweise hohen Streuung der Daten das Vorliegen einer repräsentativen Stichprobe unwahrscheinlicher machen, sind einige weitere Faktoren vorstellbar, welche den abweichenden Beobachtungen des Zellwachstums zugrunde liegen könnten.

Die unterschiedlich hohen Ausplattierungseffizienzen müssen wahrscheinlich auf Veränderungen der Proliferation der Tumorzellen selbst zurückgeführt werden. Für beide Versuchsreihen konnten Variablen gefunden werden, welche das Zellwachstum beeinflussen haben könnten. Hierfür kommt zum einen die für beide Teilversuche unterschiedlich hohe Passagezahl infrage. Zum anderen ist es vorstellbar, dass äußere Faktoren wie ein während der

ersten Versuchsreihe notwendiger Fungin-Zusatz sowie die unterschiedlichen Transportbedingungen beider Teilversuche, einen Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen gehabt haben könnten.

Trotz des zeitnahen Einfrierens aller isolierten Zelllinien, wiesen die Zellen, mit denen die Koloniebildungstests 2017 und 2018 durchgeführt wurden, unterschiedlich viele Passagen auf. Die Passagezahlen der 2017 konservierten Zellen lagen zwischen vier und zwölf Passagen. Nach der Wiederaufnahme der CFA im Januar 2018 verzögerte sich die eigentliche Durchführung der Tests allerdings um mehrere Wochen, da die Dosimetrie der neuen Bestrahlungseinheit *Xstrahl* mehr Zeit in Anspruch nahm als zunächst angenommen wurde. Somit war die Passagezahl der FaDu-Tumorzellen, mit denen die Koloniebildungstests der zweiten CFA-Versuchsreihe angesetzt wurden, zum Teil doppelt so hoch, als die der ersten. Dies könnte insofern relevant sein, als dass die nach der *in vivo* Analyse des Tumorwachstums isolierten FaDu-Zellen als potentiell in ihrem Geno- und Phänotyp veränderte Subklone betrachtet werden müssen. Mit voranschreitender Dauer der *in vitro* Kultivierung könnten sich innerhalb dieser Zellpopulationen Klone mit verändertem Wachstumsverhalten durchgesetzt haben. Gleichzeitig werden länger kultivierte Zellen ebenfalls anfälliger für eine zusätzliche genetische Drift, welche ebenfalls eine Veränderung der Zellproliferation bedingen kann. Anhand von Glioblastomzellen konnte gezeigt werden, dass länger kultivierte Subklone eine gesteigerte *in vitro* Proliferationsrate aufwiesen (Torsvik et al., 2014). Diese Beobachtung würde zu den signifikant höheren Ausplattierungseffizienzen der zweiten Versuchsreihe passen, welche zumindest für beide mit 3 Gy bestrahlten Gruppen sowie für die mit 5 Gy homogen bestrahlten Zellen dokumentiert wurde. Nimmt man an, dass genotypische Veränderungen für die vorbestrahlten Zellen, durch eine Selektion bestimmter Subklone, wahrscheinlicher wären als für die nicht bestrahlten Kontrollen, ließe sich so deren für beide Teilversuche vergleichbare PE erklären.

Zusätzlich zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen innerhalb der 2018 durchgeführten CFA ist es denkbar, dass das Zellwachstum während der Versuchsreihe 2017 gehemmt wurde. Ein möglicher Faktor könnte hierbei der Einsatz von Fungin etwa fünf Wochen nach der Isolation der FaDu-Tumorzellen sein. Zu diesem Zeitpunkt wurde für jeweils eine Zellkulturflasche zweier Zelllinien eine Kontamination mit Pilzen festgestellt, woraufhin dem verwendeten Zellmedium zeitweise wieder Fungin beigemischt wurde. Im zeitlichen Verlauf fiel auf, dass die FaDu-Zellen eine verzögerte Adhärenz und ein langsames Wachstum aufwiesen. Auch schienen sich in dieser Zeit in den durchgeführten CFA weniger und kleinere Kolonien auszubilden. Unter der Vermutung, dass das Antimykotikum diesen Effekt ausgelöst

haben könnte, wurde in der Folge beim Passagieren für jede Zelllinie immer jeweils eine Zellkulturflasche mit sowie eine ohne Fungin-Zusatz vorbereitet. Alle Koloniebildungstests wurden aus letzteren und ebenfalls mit zusätzlichem Zellmedium ohne das Fungizid angesetzt. Fungin ist eine lösliche Form des Antimykotikums Pimaricin, welches ein Monopräparat basierend auf dem Wirkstoff Natamycin ist. Das Reagenz wirkt gegen Hefen und Schimmelpilze, indem es den Ionenaustausch ihrer Zellmembran stört und kann sowohl zur Prävention als auch zur Dekontamination eingesetzt werden (FunginTM Antifungal Reagent, 2020). Es konnte allerdings beobachtet werden, dass dieser Wirkstoff, sogar bei der für die Zellkultur empfohlenen Dosierung, die Zellproliferation von humanen Fibroblasten und Zellen aus der Amnionflüssigkeit hemmte (Butterworth, 1982). Auch auf Prostatakarzinomzellen konnte eine antiproliferative Wirkung von Natamycin nachgewiesen werden, welche über eine Hemmung der Basen-Exzisionsreparatur vermittelt wurde (Vasquez et al., 2020). Schon in niedriger Konzentration zeigte Natamycin ebenfalls einen gravierenden zytotoxischen Effekt auf Primärkulturen von equinen Kornealkeratinozyten. Zum einen konnten morphologische Veränderungen der Zellen beobachtet werden, welche abgerundet und kleiner erschienen und sich aus der Zellkultur lösten. Zum anderen waren sie in ihrer Proliferation gehemmt (Mathes et al., 2010). Diese Beobachtungen an Zellen, welche ebenfalls epithelialen Typs sind, passen gut zu den hier dokumentierten Auffälligkeiten der FaDu-Zellen nach der erneuten Zugabe des Fungins. Trotz des Durchführens der Koloniebildungstests ohne Fungin sollte nicht ausgeschlossen werden, dass das in der Kultur eingesetzte Reagenz einen längerfristigen Effekt auf die Zellen ausgeübt haben könnte. Diese Vermutung würde zu den voneinander abweichenden Ausplattierungseffizienzen innerhalb der beiden CFA-Versuchsreihen passen. So könnte sich die niedrigere PE innerhalb der 2017 durchgeführten CFA, welche zumindest für beide homogen bestrahlte Gruppen sowie für die 3 Gy MRT-Gruppe beobachtet werden konnte, möglicherweise durch eine Fungin-vermittelte Hemmung der Proliferation dieser Zellen erklären lassen.

Ein weiterer Unterschied beider CFA-Versuchsreihen lag in der unterschiedlich großen Distanz beider Bestrahlungsgeräte zum Zellkulturlabor und den damit verbundenen Transportbedingungen der Koloniebildungstests. Während das 2017 eingesetzte *Gulmay* Teil des Labors am Klinikum rechts der Isar und in wenigen Minuten fußläufig zu erreichen war, mussten die Zellkulturflaschen für die Bestrahlungen am *Xstrahl* mit dem Auto transportiert werden. Während der Hin- und Rückfahrt befanden sich diese dabei in großen Styroporboxen, in die zusätzlich 37 °C warme Wärmekissen gelegt wurden. Am Helmholtz Zentrum selbst konnten sie wieder in einen portablen Brutschrank gestellt werden. Die Autofahrt nahm

allerdings 30 – 50 min in Anspruch, sodass es denkbar ist, dass die Schwankungen von Temperatur und Luftfeuchtigkeit sowie die unterschiedlichen Konzentrationen von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid einen Einfluss auf die Zellen und ihr Wachstumsverhalten genommen haben könnten. Sowohl die suboptimalen lebenserhaltenden Bedingungen als auch durch die Transportbewegungen entstehende Scherspannungen könnten die Zellen geschädigt und die Zellviabilität gestört haben (Miller et al., 2017). Bei Temperaturen unter 37 °C konnte für Zellen in vitro eine geringere Proliferationsrate mit einer bis zu doppelt so hohen Verdopplungszeit, welche ebenfalls mit einem niedrigeren Mitoseindex einher ging, dokumentiert werden (Watanabe & Okada, 1967).

Es scheint somit möglich, dass sowohl das in der Versuchsreihe 2017 eingesetzte Fungin als auch die Transportbedingungen während der Versuche 2018 einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation der Zellen gehabt haben könnten. Nimmt man weiters an, dass dieser Einfluss in etwa gleich groß war, würde dies zu den ähnlichen Ausplattierungseffizienzen der Kontrollen beider Teilversuche passen, welche beide mit etwa 6 % eher niedrig waren. Für die Gruppen deren Ausplattierungseffizienz 2018 höher lag als 2017 könnte vermutet werden, dass ihre Proliferation in der ersten Versuchsreihe durch das Fungin gehemmt wurde, im zweiten Versuch jedoch ein Subklon mit aggressiveren Wachstumsverhalten vorlag, was die negative Einwirkung durch den Transport gegebenenfalls ausgleichen konnte. Dies würde auf beide homogen bestrahlten Gruppen, sowie auf die 3 Gy MRT-Gruppe zutreffen. Die 5 Gy MRT-Gruppe zeigte jedoch in der zweiten Versuchsreihe ein langsames Wachstum als in der ersten. Somit stellt sich einerseits die Frage, ob das Fungin die Zellproliferation innerhalb dieser Gruppe nicht in dem Ausmaß beeinflussen konnte, wie es für alle anderen Gruppen wahrscheinlich der Fall war. Andererseits könnten die mit einer 5 Gy MRT behandelten Zellen dem Scherstress oder den Temperaturschwankungen beim Transport gegenüber sensibler gewesen sein als die Zellen der anderen Gruppen. Da sie auch in Hinblick auf das Zellüberleben von den anderen bestrahlten Versuchsgruppen abwichen, werden mögliche Ursachen hierfür gemeinsam mit diesem im entsprechenden Abschnitt exploriert.

Die signifikanten Unterschiede der dosisspezifischen Überlebensfraktionen sowie die voneinander abweichenden Verläufe der Überlebenskurven beider Versuchsreihen geben Anlass zu der Vermutung, dass die an beiden Bestrahlungseinheiten erzeugten Röntgenstrahlen eine unterschiedliche biologische Wirksamkeit gehabt haben könnten. Beide Strahlenquellen stammten prinzipiell vom selben Hersteller. Die Bestrahlungsanlage *Gulmay RS225* des Klinikums rechts der Isar wurde damals von dem Unternehmen *Gulmay Medical* bezogen, welches 2010 zu *Xstrahl Limited* wurde und die Radiotherapiesysteme weiter fertigte und

vertrieb (BioSpace, 2010). Das Röntgenbestrahlungsgerät *Xstrahl RS225* des Helmholtz Zentrums München entstammte derselben Produktlinie dieses Nachfolgeunternehmens. Beide Röntgenstrahlanlagen basieren auf einer 225 kV-Metall-Keramik-Röntgenröhre. Das *Gulmay* weist eine maximale Anodenspannung von 220 kV auf und kann mit 1,0 – 25,0 mA betrieben werden. Für das *Xstrahl* liegt die maximale Spannung bei 225 kV und die Stromstärke lässt sich zwischen 1,0 mA und 30,0 mA variieren. Beide Geräte beinhalten einen eingebauten 0,8 mm starken Aufhärtungsfilter aus Berilyum (Gulmay Medical Ltd., o.D. und Stern, Z., o.D.). Die Einstellungen für die Bestrahlungen der Koloniebildungstests am *Gulmay* waren auf 70 kV, 10 mA und den Aluminiumfilter #3 mit einer Dicke von 3 mm festgelegt. Hierbei wurde eine Dosisrate von etwa 0,984 Gy /min erreicht, sodass die Bestrahlungsdauer für eine Dosis von 1 Gy 61 s betrug. Auch das *Xstrahl* wurde mit 70 kV betrieben, allerdings mit einem höheren Anodenstrom von 30 mA. Die ursprüngliche Dosimetrie fand mit einem 1 mm starken Aluminiumfilter statt mit dem eine Dosisrate von 1,091 Gy /min gemessen wurde und es also 55 s dauerte, um eine Dosis von 1 Gy zu applizieren. Nach den ersten Bestrahlungen der CFA 2018 mit dem 1 mm-Aluminiumfilter konnten auf den Testplatten mit 6.400 Zellen /ml, welche eine Dosis von 8 Gy erhielten, fast keine Kolonien beobachtet werden. Es wurde vermutet, dass die am *Xstrahl* erzeugten Röntgenstrahlen unter den festgelegten Einstellungen mehr Dosis als berechnet applizierten oder zumindest einen größeren biologischen Effekt hatten. In der Folge wurde eine neue Dosimetrie mit einem 3 mm starken Aluminiumfilter durchgeführt. Mit diesem lag die Dosisrate nun bei 0,659 Gy /min, sodass es 91 s in Anspruch nahm, um 1 Gy zu applizieren. Die mittlere Energie des Röntgenspektrums am *Xstrahl* verschob sich hierdurch von 39,6 keV mit dem 1 mm-Filter zu 42,5 keV mit dem 3 mm-Filter. Für beide Bestrahlungen lässt sich ein vergleichbares initial erzeugtes Röntgenspektrum annehmen, da beide Geräte die gleiche Röntgenröhre nutzten, welche in beiden Fällen mit 70 kV betrieben wurde. Die Energie der Strahlung ist hierbei direkt abhängig von der Spitzenspannung und wird im Nachhinein noch durch den in den Strahlengang eingesetzten Filter verändert, welcher die minimale Röntgenstrahlenergie limitiert (Nickoloff & Berman, 1993). Da sowohl die fest eingebauten Berilyumfilter als auch die zusätzlichen Aluminiumfilter sich in Dicke und Material entsprachen, sollten beide Bestrahlungen mit derselben durchschnittlichen Photonenenergie durchgeführt worden sein. Die Stromstärke, mit der die jeweiligen Röntgenröhren betrieben wurden, unterschied sich allerdings für beide Versuchsreihen. Diese beeinflusst die Intensität der erzeugten Strahlung. Diese Röntgendichte verhält sich direkt proportional zu den Milliampèresekunden und kann zusätzlich auch durch die Dicke des genutzten Filters verändert werden (Nickoloff & Berman, 1993 und Themes, 2016). Vor diesem Hintergrund muss davon

ausgegangen werden, dass die Intensität der am *Xstrahl* mit 30 mA erzeugten Röntgenstrahlen über derjenigen der am *Gulmay* mit nur 10 mA generierten Strahlen lag. Dies könnte den steileren Abfall der Überlebenskurven sowie die generell in der zweiten CFA-Versuchsreihe beobachteten niedrigeren Überlebensfraktionen bei den Testdosen ≥ 4 Gy für fast alle Versuchsgruppen erklären. Auffallend war allerdings, dass sich für die mittels MRT mit 5 Gy bestrahlten Zellen in beiden Teilversuchen vergleichbare Überlebensfraktionen feststellen ließen. Auch zeigten sich keine deutlichen Unterschiede im Kurvenverlauf für beide mittels MRT behandelte Gruppen. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass die vermutlich höhere Röntgendichte, anders als für die homogen bestrahlten Zellen, einen geringeren Einfluss auf diese Versuchsgruppen gehabt haben könnte.

Es ist schwierig bei diesen voneinander abweichenden Datensätzen, welche noch dazu zu teilweise inkongruenten Aussagen zum Zellüberleben führten, denjenigen auszuwählen, der die tatsächlichen Auswirkungen einer MRT auf die Strahlensensibilität am wahrscheinlichsten abbildet. Dennoch wird im Folgenden näher auf das Zellüberleben der Versuchsgruppen und die von ihm abgeleitete Strahlensensibilität eingegangen und eine mögliche Strahlenresistenz nach einer MRT diskutiert.

Zellüberleben und Strahlensensibilität

Aus keiner der beiden Versuchsreihen ergab sich ein expliziter Hinweis auf eine erhöhte Strahlenresistenz der Tumorzellen nach einer Behandlung mit Röntgen-Mikrokanälen. Jedoch könnten der flachere Verlauf ihrer Überlebenskurven einerseits und die Abweichungen ihrer SF sowohl von der Kontrolle als auch teilweise von ihren homogen bestrahlten Pendanten eine niedrigere Strahlensensibilität suggerieren. Die Überlebenskurve der 5 Gy MRT-Gruppe lag in der Versuchsreihe von 2018 ab einer Dosis ≥ 6 Gy oberhalb der Kurve der Kontrollen. Dieser Unterschied im Kurvenverlauf näherte sich mit einem $p = .066$ einer statistischen Signifikanz an. Weiters lag ihre Überlebensfraktion für beide Teilversuche ab einer Dosis von 4 Gy teilweise ebenfalls signifikant (Tabellen 4.5 und 4.9) oberhalb derjenigen der mit 5 Gy homogen bestrahlten Zellen. Für die 3 Gy MRT-Gruppe konnten ähnliche wenn auch subtilere Beobachtungen gemacht werden. Zum einen lag deren Überlebenskurve in der Versuchsreihe von 2018 für die Testdosis von 8 Gy ebenfalls oberhalb derjenigen der Kontrollgruppe. Zum anderen zeigte sich auch für sie ab einer Dosis von 4 Gy eine höhere SF als für ihr homogen bestrahltes Pendant. Obwohl sich nur ein Teil dieser Unterschiede als statistisch signifikant erwies, könnten diese Ergebnisse dennoch auf eine veränderte Strahlensensibilität der Tumorzellen nach einer MRT hindeuten. Hierzu würde die Beobachtung passen, dass sich der

Effekt der vermeintlich unterschiedlichen biologischen Effektivität der Röntgenstrahlen beider Bestrahlungseinheiten als einziges nicht auf die 5 Gy MRT-Gruppe ausgewirkt zu haben scheint, deren Überlebensfraktion in der zweiten Versuchsreihe sogar signifikant über derjenigen der 2017 durchgeführten CFA lag. Eine erhöhte Strahlenresistenz nach einer MRT kann deshalb anhand der vorliegenden Daten trotz der Beschränktheit an signifikanten Ergebnissen nicht sicher ausgeschlossen werden.

Viele Plattenepithelkarzinome generell und auch speziell die Kopf-Hals-Tumorzelllinie FaDu weisen eine lediglich moderate Strahlensensibilität auf (Kasten-Pisula et al., 2009). Zusätzliche Strahlenresistenzen sind häufig Teil einer adaptiven Antwort von mit ionisierenden Strahlen getroffenen Zellen (*induced radioresistance*, IRR). Hierbei spielen verschiedene Prozesse eine Rolle, zu denen DNA-Reparaturmechanismen, ein Zellzyklusarrest und die Autophagie zählen (Zhang et al., 2018). Weiterhin kann eine erhöhte Anzahl von Tumorstammzellen, welche durch wiederholte Bestrahlungen im Rahmen einer zeitlich fraktionierten Radiotherapie begünstigt werden kann, zu einer größeren Kapazität sowie gesteigerten Effektivität der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden führen (Bao et al., 2006 und Sato et al., 2019). Es konnte gezeigt werden, dass ebenfalls bereits nach einer einmaligen Applikation ionisierender Strahlen eine sogenannte epitheliale-mesenchymale Transition der Tumorzellen auftreten und zu einer erhöhten Toleranz der Zellen gegenüber diesen führen kann (Sato et al., 2019). Für die Bestrahlung mit Röntgen-Mikrostrahlen sollte aufgrund ihrer besonderen inhomogenen Dosisverteilung ein weiterer Aspekt bedacht werden. Der strahleninduzierte Schaden einer MRT bleibt größtenteils auf die direkten Strahlengänge der Mikrokanäle begrenzt. Weite Bereiche der Valley-Region werden allerdings von Niedrigstrahlung (*low-dose radiation*, LDR) getroffen. Diese ist für Röntgenstrahlung mit niedrigem Energietransfer definiert als Dosis < 2 Gy bei einer Dosisrate $> 0,05$ mGy/min. Es konnte gezeigt werden, dass LDR sowohl im Normalgewebe als auch in bestimmten Tumorzellen eine moderate Strahlenresistenz induzieren kann (Yu et al., 2013 und Das et al., 2015). Weiters wurde eine Assoziation der durch Bestrahlung mit niedrigen Dosen hervorgerufenen Strahlenresistenz mit einer gesteigerten Reparatur von DNA-Schäden gefunden (Enns et al., 2015). Es kommen also mehrere Aspekte infrage, welche für die Möglichkeit einer IRR nach der Bestrahlung mit Röntgen-Mikrokanälen sprechen könnten. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten geben keinen expliziten Hinweis auf eine solche. Aufgrund der Diskrepanzen beider Datensätze sollte sie allerdings auch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Besonders die auffälligen Verläufe der Überlebenskurven sowie auch die abweichenden Überlebensdaten der 5 Gy MRT-Gruppe müssen Anlass dazu geben, diese Problematik mit größeren Gruppengrößen und einheitlichen

Bedingungen noch einmal zu untersuchen. Denn trotz der Aussicht auf eine einzeitige Tumorbehandlung mit einer MRT sind strahleninduzierte Radioresistenzen für den weiteren Krankheitsverlauf von großer Bedeutung. Durch sie kann das Entstehen lokaler Tumorrezidive begünstigt werden.

Derzeit erleiden mehr als die Hälfte aller Kopf-Hals-Tumor Patient*innen nach Abschluss der Therapie ein Rezidiv. Von diesen betrifft wiederum etwa die Hälfte die Lokalisation des Primärtumors (Hall et al., 2008 und Pracy et al., 2016). Laut den *NCCN Guidelines* für Kopf-Hals-Malignome können lokoregionale Rezidive und Residuen entweder primär operativ und anschließend mit einer adjuvanten Radiotherapie, eventuell in Kombination mit einer Chemotherapie, oder direkt radiochemotherapeutisch behandelt werden. Eine Re-Irradiation kann allerdings nur in Betracht gezogen werden, solange die Strahlenreserve des Normalgewebes, welches auch kumulative Dosen nur bis zu einem bestimmten Schwellenwert tolerieren kann, dieses noch zulässt (Pfister et al., 2020 und Sato et al., 2019). Das Überleben nach diesen sogenannten Salvage-Therapien ist noch immer schlecht und liegt zwischen nur einigen Monaten und wenigen Jahren (Lefebvre et al., 2012). Ein denkbarer Ansatz der die Tumorkontrolle verbessern und wahrscheinlich dennoch die Strahlenreserve größer halten könnte, wäre der Einsatz einer Röntgen-Mikrokanalbestrahlung als zusätzlicher Boost nach einer zeitlich fraktionierten konventionellen Radiotherapie. Bouchet et al. (2016a) konnten feststellen, dass ein MRT-Boost bestehend aus zwei Bestrahlungen à 8 Gy, welcher nach einer konventionellen Bestrahlung mit drei Fraktionen à 6 Gy appliziert wurde, im Vergleich zu einem homogen applizierten Boost (ebenfalls 2×8 Gy) zu einem Überlebensvorteil sowie einer Tumorstillstandsverzögerung von F98-Gliomen in Rattengehirnen führte. Diese Kombination aus zeitlicher und räumlicher Fraktionierung der Bestrahlungsdosis könnte zusätzlich dem in der Radiotherapie von Kopf-Hals-Tumoren beschriebenen Zeitfaktor entgegenwirken. Dieser beschreibt das Phänomen, dass die zur Tumorkontrolle notwendige Dosis bei Zunahme der Therapiedauer steigt (Baumann et al., 1994). Basierend auf dem für die Röntgen-Mikrostrahltherapie dokumentierten besseren Nebenwirkungsprofil kann eine größere Strahlenreserve nach einer MRT vermutet werden. Ihr Einsatz würde die Möglichkeit einer Re-Irradiation bei Tumorrezidiv wahrscheinlich verbessern. Hierfür sollte allerdings eine potenzielle MRT-bedingte negative Auswirkung auf die Strahlensensibilität sicher ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass neben den uneinheitlichen Bedingungen beider Versuchsreihen, besonders die geringe Größe der Kontrollgruppe ein Problem bei der Analyse und Interpretation der erhobenen Daten darstellte. Es erscheint sinnvoll die

Untersuchungen zur Strahlensensibilität von FaDu-Zellen nach einer MRT zu wiederholen, um so präzisere Aussagen über eine mögliche Strahlenresistenz treffen zu können. Hierzu sollte versucht werden die Gruppengrößen sowohl in Hinblick auf die Anzahl an Zelllinien als auch auf die Zahl an durchgeführten Koloniebildungstests einheitlicher zu gestalten. Weiters ist es vor dem Hintergrund der hier dokumentierten niedrigen PE vorstellbar, die CFA mit etwas höheren Zellkonzentrationen anzufertigen. Initial wurden für diese Arbeit probeweise CFA mit Konzentrationen von 500 Zellen /ml, 1.000 Zellen /ml, 2.000 Zellen /ml, 4.000 Zellen /ml und 6.000 Zellen /ml jeweils für die Dosen von 1 – 8 Gy durchgeführt, bei denen eine PE von etwa 40 % beobachtet werden konnte. Ebenso sollte eine MRT mit höheren Peak- und Valley-Dosen vor der Überlebensanalyse mittels CFA in Betracht gezogen werden. Der Vergleich mit radiobiologisch äquivalenten homogenen Dosen (vgl. Kapitel 5.1) ließe die potentielle Überlegenheit einer Röntgen-Mikrokanalbestrahlung in Hinblick auf Nebenwirkungen und Langzeitfolgen der Therapie leichter beurteilen. Durch entsprechende Anpassungen des Studiendesigns könnten dann präzisere Aussagen zum möglichen Einfluss der MRT auf die Strahlensensibilität der Zellen gemacht und in den Kontext der Effekte bestehender Radiotherapien eingeordnet werden. Diese Erkenntnisse erscheinen essenziell für die genaue Beurteilung des Potenzials der MRT sowie ihre zukünftige Implementierung in die klinische Strahlentherapie.

5.3 Chromosomenaberrationen

Mittels FISH-Analyse konnten in allen bestrahlten Gruppen mehr Translokationen beobachtet werden als in der Kontrollgruppe. Signifikant war dieser Unterschied sowohl für die 3 Gy MRT-Gruppe als auch für die homogen mit 5 Gy bestrahlten Zellen. Vergleich man beide Bestrahlungsmodi miteinander zeigten sich keine signifikanten Abweichungen. Azentrische Chromosomen kamen in allen Versuchsgruppen ubiquitär in den Zellkernen vor. Unter einer homogenen Bestrahlung schien es einen Zusammenhang einer zunehmenden Anzahl an azentrischen Fragmenten mit steigender Dosis zu geben. Die Unterschiede zeigten sich statistisch allerdings nicht signifikant. Die diesbezüglichen Daten der mit einer MRT behandelten Gruppen ließen die Vermutung eines Anzahl-Dosis Zusammenhangs nicht zu. Hier zeigten sich für die Zellen, welche eine Dosis von 3 Gy erhalten hatten, die meisten azentrischen Chromosomen. Dieser Unterschied fiel allerdings nur im Vergleich mit der Kontrollgruppe statistisch signifikant aus. Eine weitere Abweichung von der Kontrolle zeigte sich für alle bestrahlten Gruppen bezüglich einer unterschiedlichen Gewichtung der verschiedenen dokumentierten azentrischen Fragmente. Nach einer Bestrahlung, unabhängig

von der Art, zeigten sich mehr kleinere, nur aus jeweils einem Anteil beider markierter Chromosomen bestehende AF, während in der Kontrollgruppe die größeren, welche jeweils zwei Anteile beider Chromosomen aufwiesen überwogen. Dieser Unterschied war für beide mit 3 Gy bestrahlten Gruppen statistisch signifikant. Vergleich man die Ergebnisse beider Bestrahlungsmethoden, konnten keine signifikanten Differenzen festgestellt werden. Sowohl in Bezug auf Insertionen als auch auf Veränderungen der Chromosomenzahl wurden weder Unterschiede zwischen den bestrahlten Gruppen und der Kontrolle noch zwischen den zwei verschiedenen Bestrahlungsmodi gefunden.

An der MuCLS konnten bereits erfolgreich FISH-Analysen von in vitro bestrahlten nicht malignen A_L-Zellen durchgeführt werden (Burger, 2017). Diese wurden, nach einer Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen und einer entweder homogenen oder räumlich fraktionierten Dosisverteilung, auf das Vorhandensein dizentrischer Chromosomen und zentrischer Ringchromosomen hin untersucht, um das Ausmaß des strahleninduzierten zytogenetischen Schadens abzuschätzen. Es zeigte sich eine signifikant höhere Toxizität der homogenen Bestrahlung im Vergleich zu einer MRT. Für die Röntgen-Mikrostrahlen konnte eine relative biologische Wirksamkeit (RBW) von 0,18 errechnet werden. Diese Ergebnisse deuteten auf ein besseres Nebenwirkungsprofil mit einem verminderten Risiko für Sekundärtumoren nach Mikrokanalbestrahlung hin. Mit der vorliegenden FISH-Analyse der FaDu-Tumorzellen sollten diese bestehenden Beobachtungen zur reduzierten Toxizität der MRT im Normalgewebe, um Erkenntnisse über den zytogenetischen Schaden im Zielgewebe ergänzt werden. Die verwendeten FaDu-Zellen stellen eine maligne transformierte Form humaner Plattenepithelzellen dar, und weisen damit bereits chromosomale Veränderungen auf, welche zu den neoplastischen Eigenschaften der Zelllinie beitragen. Die Bestrahlung von Tumorzellen ruft zusätzliche Chromosomenaberrationen hervor, welche für die zytotoxische Wirkung der Radiotherapie verantwortlich gemacht werden. Die induzierten molekularen Schäden weisen unterschiedliche Grade an Komplexität auf und beinhalten unter anderem Läsionen der DNA-Basen, AP-Stellen¹⁰ und Einzelstrangbrüche. Die Klastogenese scheint allerdings hauptsächlich durch Doppelstrangbrüche bedingt zu sein und wird mit fehlerhaften Reparaturmechanismen der betroffenen Zellen in Zusammenhang gebracht (Loucas & Cornforth, 2013 und Santivasi & Xia, 2014). Das Vorkommen dieser zusätzlichen Veränderungen kann somit einen Hinweis darauf geben, welchen Anteil der direkte zytotoxische Effekt der Bestrahlung an der biologischen Wirksamkeit der MRT hat. Diese wird

¹⁰ AP-Stellen sind Stellen innerhalb der DNA, welche weder eine Purin- noch eine Pyrimidinbase aufweisen

überdies von vaskulären und Bystander-Effekten bestimmt, von denen angenommen wird, dass sie ebenfalls eine wichtige Rolle für die in vivo induzierte Wachstumsverzögerung der Tumoren gespielt haben sollten. Da FaDu-Zellen aufgrund ihres neoplastischen Ursprungs schon genetische Veränderungen aufweisen, sollte für die Analyse des strahleninduzierten zytogenetischen Schadens untersucht werden, welche Aberrationen in welchem Ausmaß zusätzlich in den bestrahlten Versuchsgruppen auftraten. Für das Entstehen solcher Strahlenschäden konnten Studien einerseits eine Abhängigkeit von der applizierten Dosis feststellen. Beispielsweise führte eine Dosis von 1 Gy, welche durch γ -Strahlung appliziert wurde, zu schätzungsweise 850 Pyrimidin-Läsionen, 450 Purin-Läsionen, 1.000 DNA-Einzelstrangbrüchen und 20 – 40 DSB. Andererseits konnte eine unterschiedliche biologische Effektivität für verschiedene Strahlenqualitäten beobachtet werden. Dieses Phänomen wurde auf Unterschiede in der räumlichen und zeitlichen Verteilung der Energiedeposition entlang der entstehenden Spur an Ionisations- und Exzitationsereignissen zurückgeführt. Mit ihr veränderten sich auch die Häufigkeit und die Art der entstehenden strukturellen Chromosomenaberrationen. Nicht nur die Distribution auf der Nanometerebene, sondern auch diejenige auf der Mikrometerebene schien hierbei eine wichtige Rolle zu spielen (Hill, 2018). Es ist denkbar, dass die Bestrahlung mit wenigen Mikrometer breiten Röntgenstrahlen aufgrund dieser räumlichen Fraktionierung ein unterschiedliches Muster an chromosomalen Veränderungen aufweisen könnte, was möglicherweise in einer unterschiedlichen Effektivität einer MRT im Vergleich zu einer homogenen Bestrahlung Ausdruck findet. Vor diesem Hintergrund scheint es bedeutsam die Art und Frequenz struktureller chromosomaler Veränderungen nach einer Bestrahlung mit Röntgen-Mikrostrahlen mit denjenigen nach einer homogenen Bestrahlung mit derselben mittleren Dosis zu vergleichen. Der steile laterale Dosisabfall außerhalb der Peak-Regionen konnte als für die Wirksamkeit einer MRT kritische Zone identifiziert werden (Siegbahn et al., 2006) und bildet einen wichtigen Unterschied zu homogenen Dosisverteilungen. In Hinblick dessen werden im Folgenden die Ergebnisse zu den numerischen und strukturellen Veränderungen diskutiert, eine mögliche Dosisabhängigkeit exploriert, sowie auch die eingesetzte Technik der FISH kritisch beleuchtet.

Numerische Aberrationen: Aneuploidie

Ein charakteristisches Merkmal von FaDu-Tumorzellen ist ihr aneuploider Chromosomensatz. Sie können hypoploid bis hypertriploid sein und weisen im Mittel eine Chromosomenzahl von 64 auf (Rangan, 1972). Diese Eigenschaft ist allgemein unter Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs verbreitet. Für zehn weitere HNSCC-Zelllinien konnte mit

66 – 68 Chromosomen eine ähnliche mittlere Chromosomenanzahl entsprechend einem hyperdiploiden bis hypertriploiden Chromosomensatz dokumentiert werden. Die beobachtete Aneuploidität fußte hierbei auf einer Amplifikation ganzer Chromosomen und wurde einem hohen Risiko für zentromere Aberrationen zugeschrieben. Dieses wurde mit dem p53-Status der Tumorzellen in Zusammenhang gebracht, welches in HPV-positiven HNSCC mutiert und in HPV-negativen HNSCC vermindert vorkommt (Arenz et al., 2019). Es konnte weiters gezeigt werden, dass die meisten HNSCC ausgedehnte strukturelle chromosomale Instabilitäten mit heterogenen Kopienanzahlen der verschiedenen Chromosomen aufwiesen, was häufig zu einer uneindeutigen Ploidität der Zellen führte. Auch schien die Ausprägung der Aneuploidität mit dem Tumorstadium zu korrelieren, wobei polysome Chromosomen häufiger in Tumoren, welche schon lymphogen metastasiert waren, gefunden werden konnten (Soder et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde zwar nicht die Anzahl an Chromosomen für jeden gewerteten Zellkern dokumentiert, jedoch können die in allen Versuchsgruppen regelmäßig vorkommenden Mono- und Trisomien der Chromosomen zwei und vier als Ausdruck dieser Aneuploidität angesehen werden. Der TNM-Status des Primärtumors, dem die FaDu-Zellen entstammen, ist nicht dokumentiert. Die von Rangan (1972) beschriebene klinische Präsentation des Indexpatienten deutet allerdings auf ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium hin. Hierzu passt, dass die Kontrollgruppe in dieser Arbeit ebenfalls bereits Zellen mit numerischen Aberrationen der Chromosomen zwei und vier aufwies. Auch strahleninduzierte DNA-Schäden können Ursprung zentromerer Aberrationen sein und somit mit dem hiermit verbundenen Entstehen aneuploider Zellkerne korrelieren (Maxwell et al., 2008). Anhand der vorliegenden Daten bezüglich der Kopienanzahl der Chromosomen zwei und vier innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen konnte allerdings für keine Bestrahlungsart oder -dosis auf eine erhöhte Aneuploiditätsrate geschlossen werden. Sowohl die Kontrollen als auch die MRT-Gruppen wiesen eine höhere Frequenz numerischer Aberrationen auf als die homogen bestrahlten Zellen. Diese Unterschiede erwiesen sich statistisch allerdings als nicht signifikant. So ließen die Beobachtungen noch keinen Rückschluss auf den durch die unterschiedlichen Bestrahlungsarten ausgelösten genetischen Schaden zu.

Strukturelle Aberrationen

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches weisen nicht nur in numerischer Hinsicht sondern auch auf struktureller Ebene hoch komplexe Karyotypen auf. In vitro Analysen zeigten, dass fast 60 % der untersuchten oro-hypopharyngealen Karzinome mehr als drei strukturelle Änderungen aufwiesen. Dabei waren bestimmte Chromosomenabschnitte besonders häufig von Bruchstellen betroffen, welche oft zentromere und juxtazentromere Bande betrafen. Die unter

den analysierten HNSCC am verbreitetsten Anomalien waren alle unbalanciert und basierten meist auf dem Verlust genetischen Materials. In 97 % der Fälle kam es zu einem teilweisen oder kompletten Verlust des Chromosoms 3p. Auch das Chromosom vier war unter anderem in über der Hälfte der analysierten Tumoren von einer Unterrepräsentation betroffen. Zu den häufig beobachteten Veränderungen zählten weiters das Vorkommen der Isochromosome 8q, 5p und 3q sowie von Deletionen, welche in über 60 % der analysierten Tumoren bestimmte Abschnitte der Chromosomen eins, drei, fünf, neun, 13 und 18 betrafen. Weiters wurden häufig Translokationen ganzer Chromosomenarme dokumentiert. Es wird angenommen, dass diese chromosomalen Aberrationen einen wichtigen Mechanismus für die genetische Instabilität von Kopf-Hals-Tumoren darstellen (Jin et al., 1995 und Bockmühl et al., 1996). Zu diesen Erkenntnissen passt die Tatsache, dass auch die nicht bestrahlte Kontrollgruppe der vorliegenden Arbeit mehrere strukturelle Veränderungen auf chromosomaler Ebene aufwies.

Als Korrelat für den zusätzlichen zytogenetischen Schaden der bestrahlten Tumorzellen wurden vor allem die Translokationen sowie azentrischen Fragmente mit der Beteiligung der Chromosomen zwei und vier herangezogen. Diese kamen mit der für die FISH-Analyse angewendeten WCP-Technik besonders gut zur Darstellung. Beide zählen mitunter zu den vielfach nach einer Bestrahlung beobachteten chromosomalen Aberrationen. Translokationen basieren dabei auf einfachen Austauschen nach einer fehlerhaften DSB-Reparatur, wohingegen lineare azentrische Chromosomen durch ein Ausbleiben der Reparatur von DNA-Schäden entstehen (Loucas & Conforth, 2013).

Translokationen

Viele Untersuchungen zur strahleninduzierten Klastogenese beruhen auf der Evaluation von lymphozytären Chromosomenaberrationen, welche als Maß für den verursachten zytogenetischen Schaden durch eine Bestrahlung gelten. Nach einer Bestrahlung von Lymphozyten in vitro mit 3 Gy konnte beispielsweise ein Anstieg von einfachen Translokationen um etwa 0,2 pro Zelle dokumentiert werden (Hille et al., 2010). Auch wurde beobachtet, dass Translokationen an die Folgegenerationen übertragen wurden, bei der Zellteilung also nicht verloren gingen und ihre relative Anzahl somit auch nach mehreren Zellteilungen konstant blieb (Hartel et al., 2018). Zu diesen Beobachtungen passt die in dieser Arbeit beobachtete größere Anzahl an Translokationen in allen bestrahlten Versuchsgruppen im Vergleich mit der Kontrolle. Unbestrahlte FaDu-Tumorzellen wiesen durchschnittlich 0,05 Translokationen pro Zellkern auf. Diese Zahl erhöhte sich für beide mit 5 Gy bestrahlten Gruppen auf etwa 0,09 sowie für die mit 3 Gy homogen bestrahlten Zellen auf 0,11 und für die

3 Gy MRT-Gruppe auf etwa 0,15. Diese Beobachtung würde ihrerseits für einen zusätzlichen strahleninduzierten zytogenetischen Schaden sprechen. Der Anstieg an beobachteten Translokationen war jedoch deutlich geringer als derjenige, der für humane Lymphozyten dokumentiert werden konnte. Hierfür könnte eine unterschiedliche Strahlensensibilität beider Zelllinien ursächlich sein. Überraschenderweise fiel der Zuwachs an Translokationen gegenüber der Kontrolle nicht für alle Gruppen statistisch signifikant aus. Dies könnte zum einen an der kleineren Gruppengröße der 5 Gy MRT-Gruppe sowie zum anderen an den teilweise relativ großen Fehlerbalken liegen. Die Ergebnisse beider Bestrahlungsmodi wichen nicht statistisch signifikant voneinander ab. Somit kann, im Gegensatz zu den zuvor in vitro mit nicht malignen Zellen erhobenen Daten, kein geringerer zytogenetischer Schaden im Tumorgewebe nach einer MRT vermutet werden. Eine hohe Zytotoxizität im Tumor bei einer gleichzeitig geringeren Auswirkung der ionisierenden Strahlen auf das Normalgewebe ist hierbei eine wünschenswerte Beobachtung. Sie deckt sich mit Ergebnissen aus MRT-Studien, die am Synchrotron der ESRF durchgeführt wurden und für einen bis zu fünffach höheren therapeutischen Index der Röntgen-Mikrostrahlen im Vergleich zu einer homogenen Bestrahlung sprechen (Dilmanian et al., 2002 und Dilmanian et al., 2005).

Um eine noch präzisere Aussage bezüglich des strahleninduzierten zytogenetischen Schadens machen zu können, sollten die dokumentierten Translokationen allerdings zusätzlich in klonale und andere Translokationen unterteilt werden. Für erstere wird angenommen, dass sie im Zuge der Karzinogenese entstanden sind und deshalb besonders häufig für einen bestimmten Tumor vorkommen. Alle anderen Translokationen kommen seltener vor und können während der Zellkultur als Folge der chromosomalen Instabilität oder durch zytotoxische Wirkstoffe wie beispielsweise ionisierende Strahlen entstehen (Arenz et al., 2019). Für eine solche Unterscheidung könnte beispielsweise eine *Multicolor*-FISH zum Einsatz kommen, welche mehr als zwei Chromosomen zur Darstellung bringt.

Azentrische Chromosomen

Chromosomen-Fragmente ohne Zentromer zählen zu den nicht wiedervereinigten Doppelstrangbrüchen, welche ungefähr 5 % eines strahleninduzierten zytogenetischen Schadens ausmachen (Loucas & Cornforth, 2013). Eine Evaluation von lymphozytären Chromosomenaberrationen, nach einer in vitro Bestrahlung mit 3 Gy, konnte einen Anstieg von azentrischen und dizentrischen Chromosomen um etwa jeweils 0,4 pro analysierte Zelle feststellen (Hille et al., 2010). Das Vorkommen beider chromosomaler Veränderungen in Lymphozyten konnte mit einem erhöhten Risiko an Krebs zu erkranken in Verbindung gebracht

werden. Der Risikoquotient betrug jeweils etwa 1,7. Diese Erkenntnis wird für das sogenannte Biomonitoring zum Abschätzen des Gesundheitsrisikos nach Exposition mit ionisierenden Strahlen eingesetzt (Fucic et al., 2016). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass diese instabilen Aberrationen in der Mitose verloren gingen und nicht an die Folgegenerationen der geschädigten Zellen weitergegeben wurden. Somit nahm ihre Anzahl im Verlauf der Zeit und mit jeder Zellteilung ab (Hartel et al., 2018). Die Tatsache, dass auch die unbestrahlte Kontrollgruppe dieser Studie eine nicht geringe Anzahl an azentrischen Chromosomen aufwies, spricht dafür, dass diese bereits Ausdruck der den FaDu-Tumorzellen inhärenten chromosomalen Instabilität ist.

Generell sind azentrische Fragmente Chromosomenelemente ohne Zentromer und können den inkompletten chromosomalen Elementen (ICE) zugerechnet werden. Diese können sowohl durch spontane als auch durch klastogen-induzierte DBS entstehen, betreffen meist die Chromosomenenden und stellen instabile Chromosomenaberrationen dar. An der Formation der ICE können ein oder mehrere Chromosomen beteiligt sein. Neben den azentrischen Chromosomen, welche auch als terminale Fragmente (TF) bezeichnet werden können, zählen auch inkomplette zentrische und dizentrische Chromosomen (IC) zu den ICE. In vollständigen Metaphase-Zellkernen treten diese Veränderungen immer in Paaren auf. Diese können entweder aus einem IC und einem AF, aus zwei AF begleitet von einem dizentrischen oder Ringchromosom, oder aus zwei IC in Begleitung von einem sogenannten zusammengesetzten Fragment (*compound fragment*, CF) bestehen. Diese CF sind azentrische Chromosomen, welche aus der Verbindung zweier TF entstehen. Treten azentrische Fragmente ohne die zeitgleiche Entstehung von dizentrischen Chromosomen oder zentrischen Ringchromosomen auf, werden sie als überschüssige AF bezeichnet. Diese können einerseits durch einen kompletten Austausch von DNA-Sequenzen innerhalb desselben Chromosomenarmes entstehen und entsprechen dann interstitiellen Fragment. Andererseits können auch ein inkompletter Austausch oder ein terminaler DSB zu azentrischen und zusammengesetzten azentrischen Fragmenten führen (Bolzán, 2012). Die hier dokumentierten AF sollten aufgrund ihrer Zusammensetzung aus Anteilen beider fluoreszenzmarkierter Chromosomen als CF verstanden werden. Sie müssen größtenteils als Ausdruck spontaner DNA-Schäden und deren inadäquater Reparatur innerhalb der FaDu-Tumorzellen angesehen werden, da sie in großer Zahl bereits für die Kontrollgruppe dokumentiert werden konnten. Für eine Abschätzung des strahleninduzierten zytogenetischen Schadens müssten die spontan entstehenden azentrischen Fragmente von denen durch die ionisierenden Strahlen entstandenen unterschieden werden. Eine solche Abgrenzung erscheint mit der hier angewendeten Technik schwierig. Im Vergleich

zur Kontrollgruppe deutete sich zwar für alle bestrahlten Gruppen eine höhere Anzahl an AF pro Zelle an. Diese Unterschiede waren allerdings statistisch nicht signifikant und machten mit einem durchschnittlichen Zuwachs von 0,1 pro Zelle nur einen kleinen Bruchteil der insgesamt beobachteten AF aus. Dies könnte Ausdruck davon sein, dass die relative Anzahl der strahleninduzierten AF zum Zeitpunkt der FISH aufgrund mehrerer abgelaufenen Mitosen schon stark reduziert gewesen sein müsste. Die Zeitspanne, während der mit ionisierenden Strahlen behandelte Zellen kultiviert werden, bevor eine Analyse des genetischen Schadens durchgeführt wird, beeinflusst sowohl die Art als auch die Häufigkeit der detektierbaren Chromosomenaberrationen, da nicht alle an die Folgegenerationen weitergeben werden. Um den genetischen Schaden nicht nur anhand von stabilen sondern auch instabilen chromosomalen Veränderungen präzise bestimmen zu können, sollte die Analyse daher innerhalb der ersten Zellteilung stattfinden (Jordan et al., 1999). Diese Punkte führten dazu, dass die in dieser Arbeit dokumentierten AF nicht für die Quantifizierung des strahleninduzierten zytogenetischen Schadens eingesetzt werden konnten. Hinzu kommt, dass der Zuwachs an dokumentierten azentrischen Chromosomen für beide Bestrahlungsarten in etwa gleich groß war. Auch das veränderte Verhältnis von kleinen und großen AF im Vergleich zur Kontrolle hatten alle bestrahlten Gruppen gemeinsam. Somit lässt sich anhand dieser Analyse kein unterschiedlicher zytogenetischer Effekt nach einer MRT im Vergleich zu einer homogenen Bestrahlung erkennen.

Dosisabhängigkeit

Ein durch ionisierende Strahlung induzierter zytogenetischer Schaden hängt unter anderem mit der Höhe der applizierten Dosis zusammen (Hill, 2018). In der zuvor zitierten FISH-Analyse von *in vitro* an der MuCLS bestrahlten nicht malignen A_L-Zellen von Burger (2017) konnte eine Dosisabhängigkeit für das Entstehen von dizentrischen Chromosomen und zentrischen Ringchromosomen dokumentiert werden. Deren Anzahl nahm mit der Höhe der Dosis zu. Die Beobachtung untermauert die direkte Abhängigkeit des induzierten zytogenetischen Schadens von der applizierten Gesamtdosis. Eine solche Dosisabhängigkeit konnte in der vorliegenden Arbeit weder für die Entstehung von Translokationen noch für das Vorkommen azentrischer Fragmente beobachtet werden. Andeutungsweise nahm die für die homogen bestrahlten Gruppen beobachtete Anzahl an AF mit steigender Dosis zu. Diese Unterschiede erwiesen sich jedoch als statistisch nicht signifikant. Interessanterweise zeigte sich unabhängig von der Art der Bestrahlung für beide Gruppen, die die niedrigere Dosis von 3 Gy erhalten hatten, eine stärkere Zunahme an Translokationen als für diejenigen Zellen, welche mit 5 Gy behandelt worden waren. Allerdings ließ sich weder für die MRT noch für die homogene Bestrahlung ein

statistisch signifikanter Unterschied zwischen der 3 Gy- und der 5 Gy-Gruppe feststellen. Somit konnte auch bezüglich der Anzahl an zusätzlichen Translokationen für keine der Bestrahlungsarten ein Dosisbezug hergestellt werden. Diese Beobachtungen passen zu der für FaDu-Zellen dokumentierten lediglich moderaten Strahlensensibilität (vgl. Kapitel 5.2).

Technik

Synchrotron-basierte MRT-Studien nutzten besonders histologische und immunohistochemische Färbemethoden, um die Effekte der Bestrahlung auf zellulärer Ebene zu visualisieren (Dilmanian et al., 2005, Serduc et al., 2006 und Crosbie et al., 2010). Eine Evaluation des zytogenetischen Schadens anhand von γ -H2AX-markierter DNA-Doppelstrangbrüche findet sich beispielsweise bei Crosbie et al. (2010). Die Forschenden konnten feststellen, dass die Anzahl an γ -H2AX-positiven EMT-6.5-Tumorzellen nach einer Bestrahlung mit Röntgen-Mikrokanälen bis zu 84 Stunden lang konstant blieb, während sie sich in normaler Haut halbierte. Für dieses Phänomen machten sie das Unvermögen des Tumors eine adäquate DNA-Reparatur zu unterhalten verantwortlich. Weiters vermuteten sie, dass eine Vermischung von Zellen mit letalem Schaden und nur minimal bestrahlten Zellen innerhalb des Tumorgewebes zu einer Zellkommunikation-vermittelten Steigerung des strahleninduzierten Gesamtschadens führte. Dies machte sich in einer Abnahme der Proliferation der Tumorzellen bemerkbar. Ein quantitativer Vergleich des zytogenetischen Schadens nach einer MRT mit demjenigen nach einer konventionellen Bestrahlung findet sich in dieser Studie allerdings nicht. Mit der Methode der γ -H2AX-Färbung wurden zwar die entstandenen Doppelstrangbrüche als Biomarker eines potentiell letalen chromosomalen Schadens visualisiert. Meines Wissens nach gibt bis jetzt allerdings keine Analyse der entstehenden chromosomalen Aberrationen innerhalb von mit Röntgen-Mikrokanälen bestrahlten Tumorzellen. Für eine solche Evaluation eignet sich unter anderem die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Technik der FISH, welche sowohl instabile als auch stabile Chromosomenaberrationen zur Darstellung bringen kann. Mit ihr ist es allerdings nicht möglich zwischen Zellen zu differenzieren, welche sich in unterschiedlichen Zellzyklen befinden. Dies ist, wie zuvor beschrieben, deshalb relevant, da mit der Mitose instabile strahleninduzierte Chromosomenaberrationen verloren gehen. Deren Frequenz hängt also stark von den bereits stattgefunden Mitosen ab. Für eine solche Differenzierung müsste die FISH beispielsweise mit der Methode der Harlequin-Färbung kombiniert werden, welche Zellen in unterschiedlichen Teilungszyklen über eine Kultivierung mit 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdUrd) unterscheiden kann (Jordan et al., 1999). Ein weiterer Aspekt, den die Methode der Fluoreszenz in situ Hybridisierung nicht erfasst, sind intra-chromosomale

Austausche wie Inversionen, Deletionen und Duplikationen. Auch sind einige strahleninduzierte Mutationen nicht groß genug, um durch FISH-Techniken visualisiert zu werden (Hill, 2018). Obwohl eine *Multicolor*-FISH Translokationen deutlich darstellen kann, eignet sie sich nicht zur präzisen Identifikation der genauen Abschnitte der beteiligten Chromosomen und kann somit nur schwer zwischen klonalen und anderen Translokationen unterscheiden (Arenz et al., 2019). Eine präzisere Abbildung der Gesamtheit der zytogenetischen Veränderungen nach einer MRT könnte jedoch für die Einschätzung einer potentiellen Selektion resistenterer Subklone von Bedeutung sein, welche wiederum eine wichtige Rolle für Tumorresiduen und lokale Rezidive spielen könnten.

Auch für die Strahlensensibilität der jeweiligen Tumoren spielt die Ausprägung ihrer genomischen Instabilität eine wichtige Rolle. Für HNSCC konnte festgestellt werden, dass unter anderem der HPV-Status für das Ansprechen auf eine Bestrahlung verantwortlich ist. Dabei weisen HPV-positive Tumoren eine erhöhte Strahlensensitivität auf, welche auf eine fehlerhafte Zellzykluskontrolle mit G2-Arrest und eine unzulängliche DNA-Reparatur mit verbleibenden DSB zurückgeführt werden konnte (Rieckmann et al., 2013). Für die Unterschiede in der genetischen Instabilität von HNSCC werden zwei verschiedene Hauptwege der Kanzerogenese verantwortlich gemacht. Während für Tabak- und Alkohol-induzierte Tumoren ein mehrstufiger Prozess bestehend aus kontinuierlichen DNA-Schäden und einem Akkumulieren von Mutationen angenommen wird, macht man für die HPV-induzierten Tumoren eine verminderte Expression der Onkogene E6 und E7 verantwortlich. Es konnte beobachtet werden, dass die chromosomale Instabilität beider Tumorentitäten in Hinblick auf strukturelle Aberrationen nicht jedoch bezüglich der Ploidität der Tumoren besteht. Die dokumentierten Unterschiede bezüglich der strukturellen Chromosomenaberrationen betrafen das Vorkommen von Translokationen. Während die beobachtete Gesamtanzahl für beide Tumor-Subgruppen bei etwa 11 Translokationen pro Zelle lag, unterschieden sich diese in Bezug auf die hauptsächlich beteiligten Chromosomen. Hier zeigte sich für die untersuchten HPV-negativen Zelllinien ein sehr heterogenes Bild, während in HPV-positiven Zelllinien das Chromosom drei mit einem Anteil von 32 % an allen beobachteten Translokationen besonders involviert war. Auch die Chromosomen zwei, vier und fünf waren vergleichsweise häufig beteiligt (Arenz et al., 2019). Die Zelllinie FaDu ist HPV-negativ. Es konnte gezeigt werden, dass FaDu-Tumoren fünfmal schlechter auf eine Bestrahlung ansprechen als Tumoren aus HPV-positiven HNSCC Zelllinien (Kranjc Brezar et al., 2020). Dieses schlechte Ansprechen auf eine Radiotherapie macht einen wichtigen Aspekt der schlechten Prognose vieler Kopf-Hals-Tumoren aus. Trotz eines ähnlichen Ausmaßes des direkten zytotoxischen Effektes von

MRT und homogener Bestrahlung, könnte die Behandlung mit Röntgen-Mikrostrahlen dennoch zu einem verbesserten Therapieergebnis führen. Der für die räumlich fraktionierte Bestrahlung beobachtete charakteristische Effekt auf das tumorale Gefäßnetz führt unter anderem zu einer vorübergehend erhöhten Permeabilität der geschädigten Blutgefäße. Dies könnte beispielsweise zu einer gezielten Applikation von Chemotherapeutika genutzt werden und somit die Effektivität der Kombinationstherapie steigern (Serduc et al., 2008, Bouchet et al., 2010).

In Zusammenschau mit den Ergebnissen der CFA-Analyse wäre es gegebenenfalls sinnvoll eine weitere Versuchsreihe an der MuCLS mit einer strahlensensibleren Zelllinie anzuschließen. Für eine solche wären deutlichere Unterschiede hinsichtlich einer potentiell durch die Behandlung erhöhten Strahlenresistenz anzunehmen. Auch wäre ein deutlicherer Anstieg der Chromosomenaberrationen zu erwarten, welcher mit höherer Wahrscheinlichkeit zu einem signifikanten Ergebnis führen könnte. Zudem könnte die Durchführung einer *Multicolor*-FISH mit dem Anfärben von mehreren Chromosomen und dem Fokus auf der Dokumentation von Translokationen hilfreich sein, welche bestenfalls innerhalb der ersten Mitose nach der Bestrahlung durchgeführt werden sollte. Ein so angepasster Versuchsaufbau hätte das Potenzial aussagekräftigere Ergebnisse bezüglich des strahleninduzierten zytogenetischen Schadens der Tumorzellen zu ermöglichen. Er müsste allerdings losgelöst von einer vorausgehenden Tumorstadiumsanalyse umgesetzt werden.

5.4 Synopse

Um eine experimentelle Technik wie die Röntgen-Mikrokanalbestrahlung in die klinische Anwendung zu überführen, müssen ihre Effektivität und ihre Kosteneffizienz gegeneinander abgewogen werden (Nickoloff, 2015). Die vorliegende Arbeit, welche mit der MuCLS eine innovative kompakte Synchrotronstrahlenquelle einsetzen konnte, leistet bezüglich der zukünftigen Praktikabilität sowie der Therapiekosten einer MRT im klinischen Alltag einen wichtigen Beitrag. Gemeinsam mit den vorausgegangenen *proof of principle*-Studien (Burger, 2017 und Dombrowsky et al., 2020) konnte gezeigt werden, dass es möglich ist an der MuCLS wenige Mikrometer breite, präzise Mikro-Röntgenstrahlen zu erzeugen und diese sowohl für *in vitro* als auch für *in vivo* Bestrahlungen bereitzustellen. Dies wird eine zukünftige intensivere Erforschung der bis jetzt noch präklinischen MRT ermöglichen und deren Translation in die Klinik fördern. In Hinblick auf das Ausmaß der Effektivität der Röntgen-Mikrokanalbestrahlung allgemein ist es wichtig verschiedene Anwendungsbereiche zu definieren. Die meisten Studien zur MRT untersuchten deren Wirkung auf zerebrale Tumoren

und konnten zeigen, dass diese erstaunlich gut auf die neue Therapieform ansprachen (Laissue et al., 1998, Dilmanian et al., 2002, Dilmanian et al., 2003b, Serduc et al., 2006, Smilowitz et al., 2006, Regnard et al., 2008, Serduc et al., 2008, Serduc et al., 2009, Bouchet et al., 2010 und Bouchet et al., 2016a). In dieser Arbeit sollte mit der Zelllinie FaDu, stellvertretend für Plattenepithel-Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches, eine weitere Tumorentität mit einer ebenfalls schlechten Prognose und ähnlich komplizierten Lagebeziehungen als mögliches Anwendungsgebiet der MRT erschlossen werden. Für die Evaluation der Effektivität neuer Bestrahlungsformen ist es weiters wichtig einen Vergleich zu etablierten Radiotherapien herzustellen. Außerdem gilt es die Mechanismen zu verstehen, die der Wirksamkeit zugrunde liegen. Beide Aspekte fanden sich in den hier durchgeführten Versuchen wieder. Zum einen fand der Vergleich mit einer homogenen Bestrahlung mit den jeweils gleichen mittleren Dosen statt. Zum anderen wurden Chromosomenaberrationen als Korrelat für die biologische Effektivität sowie das klonogene Zellüberleben nach einer weiteren Bestrahlung als Hinweis auf Veränderungen der Strahlensensibilität untersucht. Beide Merkmale dienen neben dem besseren Verständnis der Wirkweise einer MRT auch der Einschätzung potentieller negativer Effekte, zu denen die Selektion von strahlenresistenten Subklonen und das Risiko von Residuen oder Rezidiven zählen.

Aus der initial durchgeführten Analyse des Tumorwachstums ließ sich der Schluss ziehen, dass eine Anpassung der Bestrahlungsparameter für eine erfolgreichere Tumorkontrolle notwendig sind. Besonderer Fokus sollte hierbei auf die Peak- und Valley-Dosen sowie auf das Verhältnis von Breite und Abstand der Mikrostrahlen gelegt werden. Zusätzlich zu einer weiteren Studie zur Tumorkontrolle sollte ebenfalls überlegt werden, einen länger angelegten Versuch zur Beurteilung des Überlebens durchzuführen. Das Überleben nach einer Therapie ist für die Betroffenen das relevanteste Ergebnis, noch vor der lokalen Tumorkontrolle (Nickoloff, 2015). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Lebensqualität der Patient*innen während und nach der Therapie. Für diese spielt das Nebenwirkungsprofil einer Therapie eine große Rolle. Aspekte potentieller Nebenwirkungen der MRT sollten in der hier durchgeführten Arbeit sowohl durch die Ergebnisse der Koloniebildungstests als auch durch die Resultate der Fluoreszenz in situ Hybridisierung charakterisiert werden. Beide gaben weder einen eindeutigen Hinweis auf eine veränderte Strahlensensibilität noch auf Unterschiede in der genetischen Instabilität der Zellen, welche mit Röntgen-Mikrokanälen behandelt worden waren. Allerdings präsentierten sich die Ergebnisse der CFA als zu heterogen, um eine potentielle Strahlenresistenz ausschließen zu können. Da diese jedoch unter anderem den möglichen Einsatz weiterer therapeutischer Maßnahmen bei Tumorresiduen und -rezidiven bestimmt, stellt sie einen wichtigen Faktor für

das langfristige Therapieergebnis dar. Es wäre deshalb von Interesse eine weitere Versuchsreihe mit größerer Stichprobenzahl und einheitlichem Versuchsaufbau durchzuführen, um potentielle Negativeffekte einer MRT definitiv ausschließen zu können. Anhand der FISH konnte ein ähnlich hoher Zuwachs an Translokationen und azentrischen Fragmenten für beide Bestrahlungsmodi dokumentiert werden. Der auf diesem Wege analysierte direkte zytotoxische Schaden gab somit ebenfalls keinen Hinweis auf einen Nachteil einer MRT gegenüber einer homogenen Bestrahlung. Allerdings scheint eine Ergänzung der Untersuchung durch eine *Multicolor*-FISH, welche mehr als zwei Chromosomen einschließen und ihren Fokus besonders auf Translokationen legen sollte, dennoch sinnvoll. Sie könnte zusätzlich die potentiell unterschiedlichen Schädigungsmuster beider Dosisverteilungen analysieren und ein besseres Verständnis der strahlenbiologischen Wirkung einer MRT auf neoplastische Zellen schaffen.

Neben einem präziseren radiobiologischen Verständnis der MRT sind mehrere praktische Aspekte notwendig, um die Technik auch klinisch an Patient*innen anwenden zu können. Hierzu zählt die Entwicklung neuer Hard- und Software, wie beispielsweise ein Positionierungssystem und eine Therapieplanungssoftware, die MRT Bilder inkorporieren kann (Grotzer et al. 2015). Um klinische Versuche mit Röntgen-Mikrostrahlen sicher an humanen Krebspatient*innen durchführen zu können, sind laut einem Review von Wright (2015) zusätzlich mehrere Anpassungen der Bestrahlungsparameter notwendig. Ein Problem stellen die bis jetzt verwendeten Photonenenergien dar. Bisher wurden MRT-Studien mit mittleren Photonenenergien zwischen 50 keV und 150 keV durchgeführt, um durch möglichst wenige Streuungseffekte die Dosisverteilung im Gewebe so präzise wie möglich zu halten. Monte Carlo-Simulationen von Dilmanian et al. (2005) sahen eine Strahlenenergie von 250 keV als ein oberes Limit für die Erzeugung von Röntgen-Mikrostrahlen an. Die niedrige Energie limitiert jedoch die Eindringtiefe der Strahlung und reicht nicht aus, um tiefer gelegene Tumoren im Menschen zu erreichen. Die bis jetzt an der MuCLS für in vivo Bestrahlungen eingesetzte Röntgenenergie liegt mit 25 keV sogar noch niedriger. Die aus ihr resultierende oberflächliche Strahlendeponierung erforderte deshalb den Einsatz des Tumor-Ohr-Modells der Maus. Höher energetische Photonen hätten allerdings eine Änderung der Dosisverteilung mit einem flacheren Dosisabfall und einer höheren Valley-Dosis durch gesteigerte Streuungseffekte zur Folge. Laut Wright (2015) wäre ein möglicher Ansatz höhere Energien in Kombination mit schmalen Mikrostrahlen einzusetzen und so die Peak-Region, in welcher die strahleninduzierten Schäden entstehen, schmal genug zu halten, um eine adäquate Regeneration des Gewebes dennoch zu ermöglichen. Auch die gewählte Strahlengeometrie spielt für eine sichere Dosisapplikation im Menschen eine wichtige Rolle. In präklinischen Versuchen von

Bräuer-Krisch et al. (2005) konnte die effektivste Tumorkontrolle durch eine co-planare Bestrahlung mit ineinandergreifenden Röntgen-Mikrokanälen erzielt werden, welche im Zielvolumen eine quasi homogene Dosisverteilung entstehen ließ. Diese Technik wäre im klinischen Setting allerdings nicht sicher umsetzbar, da bereits kleinste Bewegungen des*der Patienten*Patientin in der Größenordnung eines Mikrostrahls zu einem Verlust des antizipierten Strahlenmusters führen würden. Laut Wright (2015) könnte allein die Repositionierung des*der Patienten*Patientin oder der Strahlenquelle, die für die Bestrahlung aus mehreren Richtungen nötig wäre, schon zu größeren Abweichungen führen. Eine mögliche Alternative zu der ineinandergreifenden Strahlengeometrie könnte jedoch eine cross-planare Technik sein, bei der sich die Mikrostrahlen im Zielvolumen überschneiden und sich die Dosen an den Schnittstellen addieren. So würde im Tumor zwar keine homogene Dosisverteilung entstehen, jedoch würde sein Gefäßnetz durch die Dosisüberlagerungen punktuell unterbrochen. Eine resultierende Ischämie könnte dann ebenfalls zu einer erfolgreichen Ablation des Tumors führen.

Es ist klar erkennbar, dass die MRT-Forschung innerhalb der letzten Jahrzehnte bereits immense Fortschritte erzielen konnte, welche sie zu einer vielversprechenden neuen Form der Radiotherapie machen. Es steht allerdings ebenso außer Frage, dass diese Technik in Hinblick auf ihre Translation in den klinischen Anwendungsbereich noch ganz am Anfang steht. Die Etablierung eines Versuchsaufbaus zur Erzeugung von Röntgen-Mikrostrahlen an der kompakten Strahlenquelle MuCLS stellt für diesen Prozess einen essentiellen Schritt dar. Denn das Set-up an der MuCLS erleichtert die Durchführung zukünftiger Versuche mit Röntgen-Mikrostrahlen und wird es unter anderem ermöglichen auch weitere Tumorentitäten in die Erforschung potentieller Anwendungsgebiete einzuschließen. Hierfür ist auch das in dieser Arbeit erfolgreich umgesetzte Tumor-Ohr-Modell von entscheidender Bedeutung. Die vorliegenden Daten bilden eine wichtige Grundlage für die weitere Versuchsoptimierung. Sie können sowohl als Anstoß für weitere Studien zu einer möglichst idealen Anpassung der Bestrahlungsparameter als auch als Ausgangspunkt für eine intensiviertere Evaluation der radiobiologischen Effekte einer MRT verstanden werden.

6 Zusammenfassung

Meine Dissertation widmete sich der präklinischen Erforschung einer möglichen radiotherapeutischen Alternative in der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren. Obwohl diese Tumoren im Vergleich zu anderen Neoplasien eher selten sind, betreffen sie dennoch die sichtbarsten Körperstellen und beeinträchtigen fundamentale Körperfunktionen. Ihre Prognose ist zudem trotz intensivster Therapieschemata noch immer sehr schlecht. Neben der allgemein kurzen Überlebenszeit nach der Diagnosenstellung ist hierbei auch die stark eingeschränkte Lebensqualität der Betroffenen sowohl während als auch nach den therapeutischen Maßnahmen von besonderer Bedeutung. Es besteht noch viel Potential innerhalb der herausfordernden Behandlung von Patient*innen mit Kopf-Hals-Tumoren. Das Ziel sollte es sein den Therapieerfolg zu verbessern, ohne die Morbidität der Betroffenen zu erhöhen. Hierfür müssen die Toxizität und die Nebenwirkungen der Therapien auf ein Minimum reduziert werden. Um dies zu erreichen muss eine zum Einsatz kommende Radiotherapie eine letale Dosis an den Tumor applizieren und dabei gleichzeitig die Dosis, welche das umliegende Gewebe erreicht, möglichst klein halten, um im Falle der Kopf-Hals-Tumoren lebenswichtige Strukturen zu schonen. Ein vielversprechender Ansatz stellt die präklinische Technik der Röntgen-Mikrokanalbestrahlung dar, welche seit den 1990er Jahren fast ausschließlich an großen Synchrotronanlagen erforscht wird. Ihr charakteristisches Merkmal ist eine räumlich fraktionierte, inhomogene Dosisverteilung im Zielvolumen. Diese entsteht durch die Aufspaltung des Röntgenstrahls in mehrere parallele nur wenige Mikrometer breite Röntgenstrahlen in festen Abständen zueinander. Vorausgehende Studien, welche sich primär neuronalem Gewebe und zerebralen Tumoren von Ratten widmeten, konnten bereits zu vielversprechenden Ergebnissen sowohl für die lokale Tumorkontrolle als auch für die Toleranz des Normalgewebes führen. Im Vergleich zu einer homogenen Bestrahlung wurde für die MRT ein bis zu fünffach höherer therapeutischer Index postuliert. Die Bestrahlungen der vorliegenden Arbeit wurden im Gegensatz zu den bisherigen MRT-Studien an einer innovativen kompakten Strahlenquelle durchgeführt, welche auf dem Prinzip der inversen Comptonstreuung von Elektronen an Laserphotonen beruht. Sie sollte hierdurch einen wichtigen Beitrag zur intensiveren Erforschung dieser räumlich fraktionierten Bestrahlungstechnik leisten, indem sie ihren Einsatz leichter zugänglich macht und ihn für einen größeren Kreis an Wissenschaftler*innen öffnet. Sie kann deshalb als essentieller Schritt auf dem Weg der Translation der MRT in den klinischen Anwendungsbereich angesehen werden. Die spezielle Fragestellung bezog sich auf den Vergleich der Effektivität von Röntgen-Mikrostrahlen mit derjenigen einer konventionellen homogenen Bestrahlung hinsichtlich der

lokalen Kontrolle von FaDu-Tumoren sowie ihrer direkten Zytotoxizität. Hierfür wurde eine dreiteilige Versuchsreihe konzipiert. In einem ersten Schritt wurde das Wachstum der Tumoren in den Ohren von Nacktmäusen *in vivo* dokumentiert und bezüglich einer Verzögerung durch die unterschiedlichen Bestrahlungen ausgewertet. Im Anschluss fand eine Isolation der Tumorzellen statt, um sie *in vitro* mittels Koloniebildungstests und FISH-Analysen auf ihre Strahlensensibilität und ihren zytogenetischen Schaden hin zu evaluieren. Ziel war es das Setup an der MuCLS für *in vivo* Bestrahlungen mit Röntgen-Mikrokanälen zu etablieren und mit den erhobenen Ergebnissen an die zuvor beschriebene therapeutische Wirksamkeit einer MRT an großen Teilchenbeschleunigern anzuknüpfen.

Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist Röntgen-Mikrostrahlen an der MuCLS zu erzeugen und diese für *in vivo* Bestrahlungen bereitzustellen. Hierfür konnte ebenfalls erfolgreich das Tumor-Ohr-Modell rezipiert werden. Eine Wachstumsverzögerung deutete sich allerdings nur für die homogen mit 5 Gy bestrahlten FaDu-Tumoren an. Das Ergebnis des *in vivo* Teils der Arbeit kann als Ausgangspunkt für die Konzeption zukünftiger MRT-Studien an der MuCLS angesehen werden. Die Daten geben den Anstoß für mögliche Optimierungen des Versuchsaufbaus und hier besonders der Bestrahlungsparameter. Ähnliches gilt auch für die Ergebnisse der FISH-Analyse, welche bereits multiple Chromosomenaberrationen innerhalb der Kontrollgruppe, als Korrelat der genomischen Instabilität der FaDu-Tumorzellen, zur Darstellung bringen konnte. Eine deutliche Abweichung zeigte sich für die bestrahlten Gruppen ausschließlich für das Vorkommen von Translokationen. Diese traten unabhängig von der Bestrahlungsart und -dosis häufiger auf als in den nicht bestrahlten Zellen und konnten somit als Maß für den zusätzlichen strahleninduzierten zytogenetischen Schaden angesehen werden. Um diesen genauer quantifizieren zu können, ist es denkbar in zukünftigen Untersuchungen mehrere Chromosomen anzufärben und den Fokus der Untersuchung auf die Klassifikation der Translokationen zu legen. Die Ergebnisse der Koloniebildungstests waren im Einklang mit der Tatsache, dass FaDu-Zellen wie allgemein viele Plattenepithel-Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches eine lediglich moderate Strahlensensibilität aufweisen. Es konnte kein klarer Hinweis auf eine erhöhte Strahlenresistenz nach einer Behandlung mit Röntgen-Mikrostrahlen gefunden werden. Allerdings ließ die Heterogenität der Daten auch keinen sicheren Ausschluss zu. Eine Wiederholung des Versuchs mit einer größeren Stichprobenzahl und einem einheitlicheren Aufbau würde das Verständnis der zellulären Veränderungen nach einer MRT verbessern. Diese Veränderungen könnten von großer Relevanz für das Langzeit-Therapieergebnis sein.

Insgesamt stellt diese Forschungsarbeit einen wichtigen Schritt für die MRT-Forschung dar, da sie zeigen konnte, dass es möglich ist diese vielversprechende Bestrahlungstechnik unabhängig

von großen Synchrotronanlagen einzusetzen. Dies spielt für eine zukünftige klinische Anwendung der Röntgen-Mikrostrahltechnik eine große Rolle. Die vorliegenden Ergebnisse können hauptsächlich als Ausgangspunkt für zukünftige Forschungskonzepte und impulsgebend für die weitere Optimierung der MRT-Bestrahlungsparameter angesehen werden. Versuche mit weiteren Tumorentitäten und höheren Dosen sowie verschiedenen Breite-Abstand-Verhältnissen der Mikrostrahlen werden zukünftig das strahlenbiologische Verständnis der MRT-Technik erweitern können.

Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Einrichtung
Fakultät für Medizin

der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Effekte der in vivo Röntgen-Mikrostrahltherapie an einer kompakten Strahlenquelle auf humane Hypopharynxkarzinomzellen (FaDu)

in der Klinik und Poliklinik für Radioonkologie und Strahlentherapie des Klinikums rechts der Isar

Fakultät, Institut, Lehrstuhl, Klinik, Krankenhaus, Abteilung

unter der Anleitung und Betreuung durch: Prof. Thomas E. Schmid ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Ab. 6 und 7 Satz 2 angebotenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Die vollständige Dissertation wurde in _____ veröffentlicht. Die promotionsführende Einrichtung

hat der Veröffentlichung zugestimmt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Ich habe bereits am _____ bei der Fakultät für _____

der Hochschule _____

unter Vorlage einer Dissertation mit dem Thema _____

die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis: _____

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich

einverstanden,  nicht einverstanden.

Wien, 30.12.2020, Unterschrift

Tabelle A.1

TMN-Klassifikation des Hypopharynx-Karzinoms des American Joint Committee on Cancer (AJCC)

| | | TNM - Klassifikation | | |
|-----|---|----------------------|--|-------------------------|
| T | | N | | M |
| TX | Primärtumor kann nicht beurteilt werden | NX | Regionale Lymphknoten (LK) können nicht beurteilt werden | M0 Keine Fernmetastasen |
| Tis | Carcinoma in situ | N0 | Keine regionalen Lymphknoten-Metastasen | M1 Fernmetastase(n) |
| T1 | Tumor limitiert auf eine der hypopharyngealen Subregionen und/oder ≤ 2 cm im größten Durchmesser | N1 | Metastase eines einzigen ipsilateralen LK, ≤ 3 cm im größten Durchmesser, ENE(-)* | |
| T2 | Tumorinvasion von mehr als einer Subregion des Hypopharynx mit einer Größe von > 2 cm aber ≤ 4 cm im größten Durchmesser, ohne Fixierung des Hemilarynx | N2a | Metastase eines einzigen ipsilateralen LK, > 3 cm aber ≤ 6 cm im größten Durchmesser, ENE(-)* ODER Metastase eines einzigen ipsilateralen LK ≤ 3 cm im größten Durchmesser, ENE(+)* | |
| T3 | Tumor > 4 cm im größten Durchmesser, oder Fixierung des Hemilarynx, oder Ausdehnung auf die ösophageale Mukosa | N2b | Metastasen in mehreren ipsilateralen LK, alle ≤ 6 cm in größten Durchmesser, ENE(-)* | |
| T4a | Moderat fortgeschrittene lokale Erkrankung: Tumor infiltriert die Cartilago thyroideus/ cricoideus, den Os hyoideus, die Schilddrüse, die ösophageale Muskulatur oder präalaryngelae Muskeln bzw. Subkutanes Fettgewebe | N2c | Metastase(n) in bilateralen oder kontralateralen LK, ≤ 6 cm im größten Durchmesser, ENE(-)* | |
| T4b | Sehr fortgeschrittene lokale Erkrankung: Tumor infiltriert die prävertebrale Faszie, ummauert die A. carotis oder breitet sich ins Mediastinum aus | N3a | LK-Metastase > 6 cm im größten Durchmesser, ENE(-) | |
| | | N3b | Metastase eines einzigen ipsilateralen LK > 3 cm und ENE(+)* ODER multiple ipsilaterale/kontralaterale/ bilaterale LK-Metastasen und ENE(+)* ODER kontralaterale LK-Metastase und ENE(+)* SOWIE alle bereits klinisch erkennbaren ENE(+) | |

Anmerkung: Diese Aufstellung entstammt den NCCN Guidelines Version 1.2020 Head and Neck Cancers des National Comprehensive Cancer Networks. Die originale Quelle dieser Informationen ist das AJCC Cancer Staging Manual, 8. Auflage (2017) herausgegeben von Springer International Publishing.

Tabelle A.2
Prognostische Einteilung der Tumorstadien des Hypopharynx-Karzinoms des American Joint Committee on Cancer (AJCC)

| Prognostische Tumorstadien | | | |
|----------------------------|---------|------------|----|
| Stadium 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stadium I | T1 | N0 | M0 |
| Stadium II | T2 | N0 | M0 |
| Stadium III | T3 | N0 | M0 |
| | T1 | N1 | M0 |
| | T2 | N1 | M0 |
| Stadium IVA | T3 | N1 | M0 |
| | T1 | N2 | M0 |
| | T2 | N2 | M0 |
| | T3 | N2 | M0 |
| Stadium IVB | T4a | N0/ N1/ N2 | M0 |
| | T4b | Jedes N | M0 |
| Stadium IVC | Jedes T | N3 | M0 |
| | Jedes T | Jedes N | M1 |

Anmerkung: Diese Aufstellung entstammt den NCCN Guidelines Version 1.2020 Head and Neck Cancers des National Comprehensive Cancer Networks. Die originale Quelle dieser Informationen ist das AJCC Cancer Staging Manual, 8. Auflage (2017) herausgegeben von Springer International Publishing.

Tabelle A.3
Tumormodell

| Zelllinie/ Mausstamm | Art | Herkunft |
|-------------------------|--|--|
| FaDu | Humanes Plattenepithel-Karzinom des Hypopharynx; Index-Patient: 56-jährig männlich (Kalkutta, Indien; 1968) | Prof. Dr. med. Baumann, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und RadioOnkologie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden |
| NMRI (nu/nu) | Nacktmaus, weiblich, 8-10 Wochen | Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) |

Tabelle A.4
Geräte

| Produkt | Hersteller |
|--|---|
| CK T2364 Edelstahl Pinzette | RS Components GmbH, Gmünd, Österreich |
| Corning® 100-1,000 µL Lambda™ Pipettierer | Corning Inc., Tewksbury, MA, USA |
| Corning® Stripettor™ Ultra Pipettierhilfe | Corning Inc., Tewksbury, MA, USA |
| Digital Vortex-Genie 2 | Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA |
| Eppendorf Research® Plus Pipette | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Fluoreszenzmikroskop Axio Vert.A1 | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |
| GentleMaCS Dissociator | Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland |
| Heraeus Multifuge 3SR Plus Centrifuge | Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland |
| Kolonie- und Sphäroidzähler GelCount™ | Oxford Optronix Ltd., Abingdon, Vereinigtes Königreich |
| Messschieber DigiMax 29422 | Wiha, Buchs, Schweiz |
| MuCLS (~ Lyncean CLS) | Lyncean Technologies, Inc., Fremont, CA, USA |
| Multipette® Plus Pipette | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Neubauer improved Zählkammer | Marienfeld Superior, Marienfeld Superior, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland |
| PIPETMAN Classic P200 Pipettierer | Gilson Incorporated, Middleton, WI, USA |
| Gulmay RS225 | ehemals Gulmay Medical, jetzt Xstrahl Limited, Camberley, Vereinigtes Königreich |
| Thermo Scientific™ BBD 6220 CO ₂ -Inkubator | Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland |
| Thermo Scientific™ Herasafe™ KS biologische Sicherheitswerkbank | Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland |
| Xstrahl RS225 | Xstrahl Limited, Camberley, Vereinigtes Königreich |

Tabelle A.5
Reagenzien

| Produkt | Hersteller |
|--|---|
| 20x SSC Buffer | Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| AFN (Atipamezole + Flumazenil + Naloxon) | Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland |
| Bepanthen® Augen- und Nasensalbe | Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland |
| Convenia | Zoetis Schweiz GmbH, Zürich, Schweiz |
| Corning Matrigel Basement Membrane Matrix; #356237, Lot: 61237013 | Corning Inc., Tewksbury, MA, USA |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland |
| Fetal Bovine Serum (Lot: BCBR0718V) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland |
| Fungin | InvivoGen, Toulouse, Frankreich |
| Gentamycin | Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| HEPES (1 M) Pufferlösung | Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| Kaliumchlorid 0,075 M (KCl) | Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| KaryoMax® Colcemid 10 µg/ ml | Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| Kochsalzlösung (NaCl) | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |
| Kristallviolett 0,1 % | Eigene Herstellung am Klinikum rechts der Isar |
| L-Glutamin 200 mM | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland |
| MMF (Medtomidin + Midazolam + Fentanyl) | Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland |
| Penicillin-Streptomycin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland |
| Sodium Pyruvat 100 mM | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland |
| Trypsin EDTA Lösung | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland |
| Tween®20 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland |
| Vectashield® HardSet™ Antifade Mounting Medium w/DAPI | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA |
| <i>XCiting Chromosome Paints (XCP)</i> , 2 - green & 4 - orange | MetaSystems Probes GmbH, Altlussheim, Deutschland |

Tabelle A.6
Verbrauchsmaterial

| Produkt | Hersteller |
|--------------------------------------|---|
| BD Falcon Cell Strainer | BD Bioscience, Bedford, MA, USA |
| Cellstar® cell culture flask | Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, Österreich |
| Cellstar® Serologische Pipetten | Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich |
| Cellstar® Tubes/ Polypropylen Röhren | Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, Österreich |
| Combitips advanced® Pipettenspitzen | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| ep.T.I.P.S® Pipettenspitzen | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Fixogum | Marabu, Marabu GmbH & Co. KG, Tamm, Deutschland |
| GentleMaCS C Tube | Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland |
| Menzel™ Mikroskop-Deckgläschen | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| Objektträger Menzel™ Gläser | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| Skalpell | Feather disposable scalpel No.22 steril, Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan |
| Zellkulturschale | TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz |
| Zellkulturtestplatten | TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz |

Tabelle A.7
Software

| Name | Hersteller |
|---------------------|--|
| GelCount™ software | Oxford Optronix Ltd., Abingdon, Vereinigtes Königreich |
| jamovi Version 1.2 | The jamovi project 2020 |
| Numbers Version 6.1 | Apple Inc. Cupertino, USA |
| R Version 4.0.2 | The R Foundation, Vienna, Austria |

Literaturverzeichnis

Achterhold, K., Bech, M., Schleede, S., Potdevin, G., Ruth, R., Loewen, R. & Pfeiffer, F. (2013). Monochromatic computed tomography with a compact laser-driven X-ray source. *Sci Rep.* 3, 1313

Allan, J. M., & Travis, L. B. (2005). Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nature reviews. Cancer.* 5(12), 943–955

American Joint Committee on cancer. (2010). *AJCC Cancer Staging Manual.* (S. B. Edge, Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F.L. & Trotti, A. Hrsg.; Seventh Edition). Springer New York Dordrecht Heidelberg London. Abgerufen 28.03.2020 von <https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Documents/AJCC%207th%20Ed%20Cancer%20Staging%20Manual.pdf>

Arenz, A., Patze, J., Kornmann, E., Wilhelm, J., Ziemann, F., Wagner, S., Wittig, A., Schoetz, U., Engenhart-Cabillic, R., Dikomey, E., & Fritz, B. (2019). HPV-negative and HPV-positive HNSCC cell lines show similar numerical but different structural chromosomal aberrations. *Head & Neck,* 41(11), 3869–3879

Bacci, A., Drebot, I., Serafini, L., Torri, V., Petrillo, V., Rossetti Conti, M., Puppini, E., Alesini, D., Bellaveglia, M., Bisesto, F., Buonomo, B., Di Pirro, G., Esposito, A., Iungo, F., Beltrano, J. J., Borgese, G., Di Raddo, G., Gallo, A., Ghigo, A., Pellegrino, L., Stella, A. & Vaccarezza, C., Cianchi, A., Agostino, R. G., Barberi, R., Ghedini, M., Martire, F., Pace, C., Dauria, G., Fabris, A. & Marazzi, M. (2016, Mai). Status of the STAR Project [Paper]. 7th International Particle Accelerator Conference (IPAC'16), Busan, Korea.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D., & Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature,* 444(7120), 756–760

Bartzsch, S. & Oelfke, U. (2017). Line focus x-ray tubes-a new concept to produce high brilliance x-rays. *Physics in medicine and biology,* 62(22), 8600–8615

Bartzsch, S., Cummings, C., Eismann, S. & Oelfke, U. (2016). A preclinical microbeam facility with a conventional x-ray tube. *Med Phys.* 43(12), 6301

Bauman, J. G., Wiegant, J., Borst, P. & van Duijn, P. (1980). A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res.* 128(2), 485-490

- Baumann, M., Liertz, C., Baisch, H., Wiegel, T., Lorenzen, J., & Arps, H. (1994). Impact of overall treatment time of fractionated irradiation on local control of human FaDu squamous cell carcinoma in nude mice. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 32(2), 137–143
- Bedford, J. S. & Mitchell, J. B. (1973). Dose-rate effects in synchronous mammalian cells in culture. *Radiation research*. 54(2), 316–327
- Begg, A. C. (1980). Analysis of growth delay data: potential pitfalls. *Br. J. Cancer Suppl.* 41(4), 93-97
- Behjati, S., Gundem, G., Wedge, D. C., Roberts, N. D., Tarpey, P. S., Cooke, S. L., Van Loo, P., Alexandrov, L. B., Ramakrishna, M., Davies, H., Nik-Zainal, S., Hardy, C., Latimer, C., Raine, K. M., Stebbings, L., Menzies, A., Jones, D., Shepherd, R., Butler, A. P., Teague, J. W., Jorgensen, M., Khatri, B., Pillay, N., Shlien, A., Futreal, P. A., Badie, C., ICGC Prostate Group, McDermott, U., Bova, G.S., Richardson, A.L., Flanagan, A.M., Stratton, M.R. & Campbell, P.J. (2016). Mutational signatures of ionizing radiation in second malignancies. *Nat Commun.* 7, 12605
- Berrington de Gonzalez, A., Curtis, R. E., Kry, S. F., Gilbert, E., Lamart, S., Berg, C. D., Stovall, M. & Ron, E. (2011). Proportion of second cancers attributable to radiotherapy treatment in adults: a cohort study in the US SEERcancer registries. *Lancet Oncol.* 12(4), 353-360
- Beyreuther, E., Brüchner, K., Krause, M., Schmidt, M., Szabo, R. & Pawelke, J. (2017). An optimized small animal tumour model for experimentation with low energy protons. *PLoS ONE.* 12(5), e0177428
- BioSpace. (2010). Gulmay Medical Becomes Xstrahl Limited to Reflect Expansion Into the Scientific Research Arena. BioSpace. Abgerufen 22.10.2020 von <https://www.biospace.com/article/releases/-b-gulmay-medical-b-becomes-xstrahl-limited-to-reflect-expansion-into-the-scientific-research-arena/>
- Blattmann, H., Gebbers, J. O., Bräuer-Krisch, E., Bravin, A., Le Duc, G., Burkard, W., Di Michiel, M., Djonov, V., Slatkin, D. N., Stepanek, J. & Laissue, J. A. (2005). Applications of synchrotron X-rays to radiotherapy. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.* 548(1-2), 17-22
- Bockmühl, U., Schwendel, A., Dietel, M., & Petersen, I. (1996). Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer research*, 56(23), 5325–5329

- Bolzán A. D. (2012). Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis*, 27(1), 1–15
- Bouchet, A., Lemasson, B., Le Duc, G., Maisin, C., Bräuer-Krisch, E., Siegbahn, E. A., Renaud, L., Khalil, E., Rémy, C., Poillot, C., Bravin, A., Laissue, J. A., Barbier, E. L. & Serduc, R. (2010). Preferential effect of synchrotron microbeam radiation therapy on intracerebral 9L gliosarcoma vascular networks. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 78(5), 1503-1512
- Bouchet, A., Sakakini, N., El Atifi, M., Le Clec'h, C., Brauer, E., Moisan, A., Deman, P., Rihet, P., Le Duc, G. & Pelletier, L. (2013). Early gene expression analysis in 9L orthotopic tumor-bearing rats identifies immune modulation in molecular response to synchrotron microbeam radiation therapy. *PLoS One.* 8(12), e81874
- Bouchet, A., Serduc, R., Laissue, J. A., & Djonov, V. (2015). Effects of microbeam radiation therapy on normal and tumoral blood vessels. *Physica medica : PM : an international journal devoted to the applications of physics to medicine and biology: official journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB)*, 31(6), 634–641
- Bouchet, A., Potez, M., Flaender, M., Schaad, L., Rome, C., Farion, R., Laissue, J., Grotzer, M., Djonov, V., Elleaume, H., Brun, E. & Serduc, R. (2016). Synchrotron X-Ray Boost in the Microbeam Radiation Therapy Mode Improves Glioma Control After Conventional X-Ray Fractions. *Int J Radiation Oncol Biol Phys.*, E94–E95
- Bouchet, A., Bräuer-Krisch, E., Prezado, Y., El Atifi, M., Rogaley, L., Le Clec'h, C. & Laissue, J. A. (2016). Better Efficacy of Synchrotron Spatially Microfractionated Radiation Therapy Than Uniform Radiation Therapy on Glioma. *Int J Radiation Oncol Biol Phys.* 95(5), 1485-1494
- Bova, R., Goh, R., Poulson, M. & Coman, W. B. (2005). Total pharyngolaryngectomy for squamous cell carcinoma of the hypopharynx: a review. *Laryngoscope.* 115(5), 864-869
- Brasemann, H. (2020). CFAssay: Statistical analysis for the Colony Formation Assay. R package version 1.22.0. Bioconductor. Abgerufen 27.07.2020 von <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/CFAssay.html>
- Brasemann, H., Michna, A., Heß, J. & Unger, K. (2015). CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. *Radiat oncol.* 10, 223
- Bräuer-Krisch, E., Bravin, A., Lerch, M., Rosenfeld, A., Stepanek, J., Di Michiel, M., Laissue, J. A. (2003). MOSFET dosimetry for microbeam radiation therapy at the European Synchrotron Radiation Facility. *Med. Phys.* 30(4), 583-589

- Bräuer-Krisch, E., Requardt, H., Regnard, P., Corde, S., Siegbahn, E. A., LeDuc, G., Blattmann, H., Laissue, J., Bravin, A. (2005). Exploiting geometrical irradiation possibilities in MRT application. *Nucl Instrum Methods Phys Res A*. 548(1-2), 69-71
- Bravin, A., Olko, P., Schültke, E. & Wilkens, J. J. (2015). SYRA3 COST Action--Microbeam radiation therapy: Roots and prospects. *Phys Med*. 31(6), 561-563
- Brüchner, K., Beyreuther, E., Baumann, M., Krause, M., Oppelt, M. & Pawelke, J. (2014). Establishment of a small animal tumour model for in vivo studies with low energy laser accelerated particles. *Radiation Oncology*. 9, 57
- Budach, W., Budach, V., Stuschke, M., Dinges, S. & Sack, H. (1993). The TCD50 and regrowth delay assay in human tumor xenografts: differences and implications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 25(2), 259-268
- Burger, K. (2017). Microbeam Radiation Therapy at a Compact Synchrotron X-Ray Source (PhD Thesis Physik). Fakultät für Physik, Technische Universität München. <https://mediatum.ub.tum.de/doc/1399928/1399928.pdf>
- Burger, K., Ilicic, K., Dierolf, M., Günther, B., Walsh, D., Schmid, E., Eggl, E., Achterhold, K., Gleich, B., Combs, S. E., Molls, M., Schmid, T. E., Pfeiffer, F., & Wilkens, J. J. (2017). Increased cell survival and cytogenetic integrity by spatial dose redistribution at a compact synchrotron X-ray source. *PloS one*, 12(10), e0186005
- Burger, K., Urban, T., Dombrowsky, A.C., Dierolf, M., Günther, B., Bartzsch, S., Achterhold, K., Combs, S.E., Schmid, T.E., Wilkens, J.J. and Pfeiffer, F. (2020), Technical and dosimetric realization of in vivo x - ray microbeam irradiations at the Munich Compact Light Source. *Med. Phys*. doi:10.1002/mp.14433
- Butterworth J. (1982). Effects of Econazole, Fungizone and Pimafucin on cell growth, lysosomal enzyme activity and sulphate metabolism of cultured human skin fibroblasts and amniotic fluid cells. *Journal of inherited metabolic disease*, 5(4), 187–191
- Cancer Genome Atlas Network (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 517(7536), 576–582
- Charles River Laboratories. (o. D.). NMRI Nude Mouse. Charles River. Abgerufen 25.04.2020 von <https://www.criver.com/products-services/find-model/nmri-nude-mouse?region=3616>

Chen, S. W., Tsai, M. H., Yang, S. N., Liang, J. A., Shiau, A. C. & Lin, F. J. (2008). Hypopharyngeal cancer treatment based on definitive radiotherapy: who is suitable for laryngeal preservation? *J Laryngol Otol.* 122(5), 506-512

Crosbie, J. C., Anderson, R. L., Rothenkamm, K., Restall, C. M., Cann, L., Ruwanpura, S., Meachem, S., Yagi, N., Svalbe, I., Lewis, R. A., Williams, B. R. G. & Rogers, P. A. W. (2010). Tumor Cell Response to Synchrotron Microbeam Radiation Therapy Differs Markedly From Cells in Normal Tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 77(3), 886–894

Curtis, H. J. (1963). The biological effects of heavy cosmic ray particles. *Life Sci Space Res.* 1, 39-47

Das, S., Singh, R., George, D., Vijaykumar, T. S., & John, S. (2015). Radiobiological Response of Cervical Cancer Cell Line in Low Dose Region: Evidence of Low Dose Hypersensitivity (HRS) and Induced Radioresistance (IRR). *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR,* 9(6), XC05–XC08

De Felici, M., Felici, R., Sanchez del Rio, M., Ferrero, C., Bacarian, T. & Dilmanian, F. A. (2005). Dose distribution from x-ray microbeam arrays applied to radiation therapy: an EGS4 Monte Carlo study. *Med Phys.* 32(8), 2455-2463

Delaney, G., Jacob, S. & Barton, M. (2005). Estimation of an Optimal External Beam Radiotherapy Utilization Rate for Head and Neck Carcinoma. *Cancer.* 103(11), 2216-2227

Denekamp, J. (1980). Is any single in situ assay of tumor response adequate? *Br. J. Cancer Suppl.* 4, 56-63

Dilmanian, F. A., Button, T. M., Le Duc, G., Zhong, N., Peña, L. A., Smith, J. A., Martinez, S. R., Bacarian, T., Tammam, J., Ren, B., Farmer, P. M., Kalef-Ezra, J., Micca, P. L., Nawrocky, M. M., Niederer, J. A., Recksiek, F. P., Fuchs, A. & Rosen, E. M. (2002). Response of rat intracranial 9L gliosarcoma to microbeam radiation therapy. *Neuro Oncol.* 4(1), 26-38

Dilmanian, F. A., Kalef-Ezra, J., Petersen, M. J., Bozios, G., Vosswinkel, J., Giron, F., Ren, B., Yakupov, R. & Antonakopoulos, G. (2003). Could X-ray microbeams inhibit angioplasty-induced restenosis in the rat carotid artery? *Cardiovasc Radiat Med.* 4(3), 139-145

Dilmanian, F. A., Hainfeld, J. F., Kruse, C. A., Cool, C. D., Sze, C.-I., Laterra, J. S., Rosen, E. M., Feldman, A., Gatley, S. J., Micca, P. L., Nawrocky, M. M., Yakupov, R. (2003).

Biological Mechanisms Underlying the Preferential Destruction of Gliomas by X-ray Microbeam Radiation. ResearchGate. Abstract No.: Dilm0599

- Dilmanian, F. A., Morris, G. M., Zhong, N., Bacarian, T., Hainfeld, J. F., Kalef-Ezra, J., Brewington, L. J., Tammam, J. & Rosen, E. M. (2003). Murine EMT-6 carcinoma: high therapeutic efficacy of microbeam radiation therapy. *Radiat Res.* 159(5), 632-641
- Dilmanian, F. A., Qu, Y., Liu, S., Cool, C. D., Gilbert, J., Hainfeld, J. F., Kruse, C. A., Laterra, J., Lenihan, D., Nawrocky, M. M., Pappas, G., Sze, C. I., Yuasa, T., Zhong, N., Zhong, Z. & McDonald, J. W. (2005). X-ray microbeams: Tumor therapy and central nervous system research. *Nucl Instrum Methods Phys Res A.* 548(1-2), 30-37
- Dilmanian, F. A., Zhong, Z., Bacarian, T., Benveniste, H., Romanelli, P., Wang, R., Welwart, J., Yuasa, T., Rosen, E. M. & Ansel, D. J. (2006). Interlaced x-ray microplanar beams: a radiosurgery approach with clinical potential. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(25), 9.709-9.714
- Dilmanian, F. A., Qu, Y., Feinendegen, L. E., Peña, L. A., Bacarian, T., Henn, F. A., Kalef-Ezra, J., Liu, S., Zhong, Z. & McDonald, J. W. (2007). Tissue-sparing effect of x-ray microplanar beams particularly in the CNS: is a bystander effect involved? *Exp Hematol.* 35(4 Suppl 1), 69-77
- Dombrowsky, A. C., Burger, K., Porth, A. K., Stein, M., Dierolf, M., Günther, B., Achterhold, K., Gleich, B., Feuchtinger, A., Bartzsch, S., Beyreuther, E., Combs, S. E., Pfeiffer, F., Wilkens, J. J. & Schmid, T. E. (2020). A proof of principle experiment for microbeam radiation therapy at the Munich compact light source. *Radiat Environ Biophys.* 59(1), 111-120
- Dupraz, K. & Amoudry, L. (2019, Oktober). ThomX project - a future intense lab-size Compton x-ray source: status and expected performances [Vortrag]. SPIE Optical Engineering + Applications, San Diego, Kalifornien, USA.
- ECOG Performance Status. (2019, Dezember 9). ECOG-ACRIN. Abgerufen 15.09.2020 von <https://ecog-acrin.org/resources/ecog-performance-status>
- Eerenstein, S. E. J., Verdonck-de Leeuw, I. M. & Leemans, C. R. (2019). Swallowing and Voice Outcomes following Treatment of Hypopharyngeal Cancer: The Need for Supervised Rehabilitation. *Adv Otorhinolaryngol.* 83, 118-125
- Eggl, E., Dierolf, M., Achterhold, K., Jud, C., Günther, B., Braig, E., Gleich, B. & Pfeiffer, F. (2016). The Munich Compact Light Source: initial performance measures. *J Synchrotron Radiat.* 23(5), 1137-1142

Eisbruch, A., Ship, J. A., Dawson, L. A., Kim, H. M., Bradford, C. R., Terrell, J. E., Chepeha, D. B., Teknos, T. N., Hogikyan, N. D., Anzai, Y., Marsh, L. H., Ten Haken, R. K. & Wolf, G. T. (2003). Salivary gland sparing and improved target irradiation by conformal and intensity modulated irradiation of head and neck cancer. *World J Surg.* 27(7), 832–837

El-Deiry, M., Funk, G. F., Nalwa, S., Karnell, L. H., Smith, R. B., Buatti, J. M., Hoffman, H. T., Clamon, G. H., Graham, S. M., Trask, D. K., Dornfeld, K. J. & Yao, M. (2005). Long-term quality of life for surgical and nonsurgical treatment of head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 131(10), 879-885

Enns, L., Rasouli-Nia, A., Hendzel, M., Marples, B., & Weinfeld, M. (2015). Association of ATM activation and DNA repair with induced radioresistance after low-dose irradiation. *Radiation protection dosimetry*, 166(1-4), 131–136

Epstein, J. B., Robertson, M., Emerton, S., Phillips, N. & Stevenson-Moore, P. (2001). Quality of life and oral function in patients treated with radiation therapy for head and neck cancer. *Head Neck.* 23(5), 389-98

Fass, D. (1998). Three-dimensional conformal radiotherapy. *Sci. Med.* 5(4), 6

Flanagan, S. P. (1966). 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res.* 8(3), 295-309

Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 1(5), 2315-2319

Fucic, A., Bonassi, S., Gundy, S., Lazutka, J., Sram, R., Ceppi, M., & Lucas, J. N. (2016). Frequency of Acentric Fragments Are Associated with Cancer Risk in Subjects Exposed to Ionizing Radiation. *Anticancer research*, 36(5), 2451–2457

FunginTM - Antifungal Reagent. (2020). InvivoGen. Abgerufen 12.10.2020 von <https://www.invivogen.com/fungin#description>; Technical Data Sheet: https://www.invivogen.com/sites/default/files/invivogen/products/files/fungin_tds.pdf

Gatta, G., Botta, L., Sanchez, M. J., Anderson, L. A., Pierannunzio, D. & Licitra, L. (2015). Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: the EURO CARE-5 population-based study. *Eur J Cancer.* 51(15), 2130-2143

Gourin, C. G. & Terris, D. J. (2004). Carcinoma of the hypopharynx. *Surg Oncol Clin N Am.* 13(1), 81-98

- Gray, J. W., Lucas, J. N., Pinkel, D. & Awa, A. (1992). Structural chromosome analysis by whole chromosome painting for assessment of radiation-induced genetic damage. *J Radiat Res.* 33(Suppl.), 80–86
- Griffin, R. J., Koonce, N. A., Dings, R. P., Siegel, E., Moros, E. G., Bräuer-Krisch, E., & Corry, P. M. (2012). Microbeam radiation therapy alters vascular architecture and tumor oxygenation and is enhanced by a galectin-1 targeted anti-angiogenic peptide. *Radiation research*, 177(6), 804–812
- Grotzer, M. A., Schültke, E., Bräuer-Krisch, E. & Laissue, J. A. (2015). Microbeam radiation therapy: Clinical perspectives. *Phys Med.* 31(6), 564-567
- Gulmay Medical Ltd. (2010). RS225 X-ray Research System. Technical Description. DocRS225C. Erhalten am 21.10.2020 von Prof. Dr. J. J. Wilkens, Medizinische Strahlenphysik, Fakultät für Medizin, Technische Universität München
- Günther, B., Gradl, R., Jud, C., Eggl, E., Huang, J., Kulpe, S., Achterhold, K., Gleich, B., Dierolf, M., & Pfeiffer, F. (2020). The versatile X-ray beamline of the Munich Compact Light Source: design, instrumentation and applications. *Journal of synchrotron radiation*, 27(Pt 5), 1395–1414
- Hadsell, M., Zhang, J., Laganis, P., Sprenger, F., Shan, J., Zhang, L., Burk, L., Yuan, H., Chang, S., Lu, J. & Zhou, O. (2013). A first generation compact microbeam radiation therapy system based on carbon nanotube X-ray technology. *Appl Phys Lett.* 103(18), 183505
- Hall, E. J., & Wu, C. S. (2003). Radiation-induced second cancers: the impact of 3D-CRT and IMRT. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 56(1), 83–88
- Hall, S. F., Groome, P. A., Irish, J. & O’Sullivan, B. (2008). The natural history of patients with squamous cell carcinoma of the hypopharynx. *Laryngoscope.* 118(8), 1362-1371
- Hartel, C., Nasonova, E., Fuss, M. C., Nikoghosyan, A. V., Debus, J., & Ritter, S. (2018). Persistence of radiation-induced aberrations in patients after radiotherapy with C-ions and IMRT. *Clinical and translational radiation oncology*, 13, 57–63
- Hawkins, P. G., Kadam, A. S., Jackson, W. C. & Eisbruch, A. (2017). Organ-Sparing in Radiotherapy for Head-and-Neck Cancer: Improving Quality of Life. *Semin Radiat Oncol.* 28, 46-52

- Heeran, A. B., Berrigan, H. P., & O'Sullivan, J. (2019). The Radiation-Induced Bystander Effect (RIBE) and its Connections with the Hallmarks of Cancer. *Radiation research*, 192(6), 668–679
- Hill M. A. (2018). Track to the future: historical perspective on the importance of radiation track structure and DNA as a radiobiological target. *International journal of radiation biology*, 94(8), 759–768
- Hille, A., Hofman-Hüther, H., Kühnle, E., Wilken, B., Rave-Fränk, M., Schmidberger, H., & Virsik, P. (2010). Spontaneous and radiation-induced chromosomal instability and persistence of chromosome aberrations after radiotherapy in lymphocytes from prostate cancer patients. *Radiation and environmental biophysics*, 49(1), 27–37
- Human Development Index (HDI) | Human Development Reports. (o. J.). United Nations Development Programme. Abgerufen 14.09.2020 von <http://hdr.undp.org/en/content/human-development-index-hdi>
- IARC. (2018). Cancer today - Cancer Fact Sheets. International Agency for Research on Cancer. Abgerufen 23.03.2020 von <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>
- Ibahim, M. J., Crosbie, J. C., Yang, Y., Zaitseva, M., Stevenson, A. W., Rogers, P. A. W. & Paiva, P. (2014). An Evaluation of Dose Equivalence between Synchrotron Microbeam Radiation Therapy and Conventional Broadbeam Radiation Using Clonogenic and Cell Impedance Assays. *PLoS ONE*. 9(6), e100547
- Jin, Y., Mertens, F., Jin, C., Akervall, J., Wennerberg, J., Gorunova, L., Mandahl, N., Heim, S., & Mitelman, F. (1995). Nonrandom chromosome abnormalities in short-term cultured primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer research*, 55(14), 3204–3210
- Jordan, R., Edington, J., Evans, H. H., & Schwartz, J. L. (1999). Detection of chromosome aberrations by FISH as a function of cell division cycle (harlequin-FISH). *BioTechniques*, 26(3), 532–534
- Kahn, J., Tofilon, P. J. & Camphausen, K. (2012). Preclinical models in radiation oncology. *Radiat Oncol*. 7, 223
- Kam, D., Salib, A., Gorgy, G., Patel, T. D., Carniol, E. T., Eloy, J. A., Baredes, S. & Park, R. C. (2015). Incidence of suicide in patients with head and neck cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 141, 1075-1081

- Kasten-Pisula, U., Menegakis, A., Brammer, I., Borgmann, K., Mansour, W. Y., Degenhardt, S., Krause, M., Schreiber, A., Dahm-Daphi, J., Petersen, C., Dikomey, E., & Baumann, M. (2009). The extreme radiosensitivity of the squamous cell carcinoma SKX is due to a defect in double-strand break repair. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 90(2), 257–264
- Kim, S., Wu, H. G., Heo, D. S., Kim, K. H., Sung, M. W. & Park, C. I. (2001). Advanced hypopharyngeal carcinoma treatment results according to treatment modalities. *Head Neck*. 23, 713-717
- King, S. N., Dunlap, N. E., Tennant, P. A. & Pitts, T. (2016). Pathophysiology of radiation-induced dysphagia in head and neck cancer. *Dysphagia*. 31, 339-351
- Köhler, A. (1909). Zur Röntgentiefentherapie mit Massendosen. *Münchener medizinische Wochenschrift*. 56(2), 2314-2316
- Kranjc Brezar, S., Prevc, A., Niksic Zakelj, M., Brozic, A., Cemazar, M., Strojjan, P., & Sersa, G. (2020). Synergistic effect of cisplatin chemotherapy combined with fractionated radiotherapy regimen in HPV-positive and HPV-negative experimental pharyngeal squamous cell carcinoma. *Scientific reports*, 10(1), 1563
- Kuo, P., Sosa, J. A., Burtness, B. A., Husain, Z. A., Mehra, S., Roman, S. A., Yarbrough, W. G. & Judson, B. L. (2016). Treatment trends and survival effects of chemotherapy for hypopharyngeal cancer: analysis of the National Cancer Data Base. *Cancer*. 122(12), 1853-1860
- Kuwahara, Y., Tomita, K., Urushihara, Y., Sato, T., Kurimasa, A., & Fukumoto, M. (2018). Association between radiation-induced cell death and clinically relevant radioresistance. *Histochemistry and cell biology*, 150(6), 649–659
- Laissue, J. A., Geiser, G., Spanne, P. O., Dilmanian, F. A., Gebbers, J. O., Geiser, M., Wu, X. Y., Makar, M. S., Micca, P. L., Nawrocky, M. M., Joel, D. D. & Slatkin, D. N. (1998). Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated X rays. *Int J Cancer*. 78(5), 654-660
- Laissue, J. A., Lyubimova, N., Wagner, H. P., Archer, D., Slatkin, D. N., Di Michiel, M., Nemoz, C., Renier, M., Bräuer-Krisch, E., Spanne, P. O., Gebbers, J. O., Dixon, K. & Blattmann, H. (1999). Microbeam radiation therapy. *Proc SPIE*. 3770, 38-45

Laissue, J. A., Bartzsch, S., Blattmann, H., Bräuer-Krisch, E., Bravin, A., Dalléry, D., Djonov, V., Hanson, A. L., Hopewell, J. W., Kaser-Hotz, B., Keyriläinen, J., Laissue, P. P., Miura, M., Serduc, R., Siegbahn, A. E. & Slatkin, D. N. (2013). Response of the rat spinal cord to X-ray microbeams. *Radiother Oncol.* 106(1), 106-111

Lakatošová, M. & Holečková, B. (2007). Fluorescence in situ hybridisation. *Biologia, Bratislava, Section Cellular and Molecular Biology.* 62(3), 243-250

Lefebvre, J. L., Chevalier, D., Luboinski, B., Kirkpatrick, A., Collette, L. & Sahmoud, T. (1996). Larynx preservation in pyriform sinus cancer: preliminary results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial. EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group. *J Natl Cancer Inst.* 88(13), 890-899

Lefebvre, J. L., Andry, G., Chevalier, D., Luboinski, B., Collette, L., Traissac, L., de Raucourt, D. & Langendijk, J. A.; EORTC Head and Neck Cancer Group. (2012). Laryngeal preservation with induction chemotherapy for hypopharyngeal squamous cell carcinoma: 10-year results of EORTC trial 24891. *Ann Oncol.* 23(10), 2708-2714

Leksell, L. (1983). Stereotactic Radiosurgery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 46, 797-803

Levsky, J. M. & Singer, R. H. (2003). Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci.* 116(14), 2833-2838

Li, H., Wawrose, J. S., Gooding, W. E., Garraway, L. A., Lui, V. W., Peyser, N. D., & Grandis, J. R. (2014). Genomic analysis of head and neck squamous cell carcinoma cell lines and human tumors: a rational approach to preclinical model selection. *Molecular cancer research : MCR,* 12(4), 571–582

Lichter, A. S. & Lawrence, T. S. (1995). Recent advances in radiation oncology. *N Engl J Med.* 332(6), 371-379

Loewen, R. J. (2003). A compact light source: Design and technical feasibility study of a LASER-electron storage ring X-ray source. (PhD Thesis Physics). Stanford University. <https://www.slac.stanford.edu/pubs/slacreports/reports03/slac-r-632.pdf>

Loucas, B. D., & Cornforth, M. N. (2013). The LET dependence of unrepaired chromosome damage in human cells: a break too far?. *Radiation research,* 179(4), 393–405

Lyncean Technologies, Inc. (o. D.). The Lyncean Compact Light Source (CLS). Abgerufen 16. April 2020, von <https://lynceantech.com/products/#compact-light-source>

- Mahalingam, S. & Spielmann, P. (2019). Quality of Life Outcomes following Treatment of Hypopharyngeal Cancer. *Adv Otorhinolaryngol.* 83, 126-134
- Mathes, R. L., Reber, A. J., Hurley, D. J., & Dietrich, U. M. (2010). Effects of antifungal drugs and delivery vehicles on morphology and proliferation of equine corneal keratocytes in vitro. *American journal of veterinary research*, 71(8), 953–959
- Maxwell, C. A., Fleisch, M. C., Costes, S. V., Erickson, A. C., Boissière, A., Gupta, R., Ravani, S. A., Parvin, B., & Barcellos-Hoff, M. H. (2008). Targeted and nontargeted effects of ionizing radiation that impact genomic instability. *Cancer research*, 68(20), 8304–8311
- Miller, P. G., Wang, Y. I., Swan, G., & Shuler, M. L. (2017). A simple cell transport device keeps culture alive and functional during shipping. *Biotechnology progress*, 33(5), 1257–1266
- Miura, M., Blattmann, H., Bräuer-Krisch, E., Bravin, A., Hanson, A. L., Nawrocky, M. M., Micca, P. L., Slatkin, D. N. & Laissue, J. A. (2006). Radiosurgical palliation of aggressive murine SCCVII squamous cell carcinomas using synchrotron-generated X-ray microbeams. *Br J Radiol.* 79(937), 71-75
- Mohiuddin, M., Fujita, M., Regine, W. F., Megooni, A. S., Ibbott, G. S. & Ahmed, M. M. (1999). High-dose spatially-fractionated radiation (GRID): a new paradigm in the management of advanced cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 45(3), 721-727
- Moran, J. M., Elshaikh, M. A., & Lawrence, T. S. (2005). Radiotherapy: what can be achieved by technical improvements in dose delivery?. *The Lancet. Oncology*, 6(1), 51–58
- Mothersill, C., Bristow, R. G., Harding, S. M., Smith, R. W., Mersov, A. & Seymour, C. B. (2011). A role for p53 in the response of bystander cells to receipt of medium borne signals from irradiated cells. *Int J Radiat Biol.* 87(11), 1120-1125
- Newman, J. R., Connolly, T. M., Illing, E. A., Kilgore, M. L., Locher, J. L. & Carroll, W. R. (2015). Survival trends in hypopharyngeal cancer: a population-based review. *Laryngoscope.* 125(3), 624-629
- Nickoloff, E. L. & Berman, H. L. (1993). Factors Affecting X-ray Spectra. *Radiographics*, 13, 1337–1348.
- Nickoloff J. A. (2015). Photon, light ion, and heavy ion cancer radiotherapy: paths from physics and biology to clinical practice. *Annals of translational medicine*, 3(21), 336

Oppelt, M., Baumann, M., Bergmann, R., Beyreuther, E., Brüchner, K., Hartmann, J., Karsch, L., Krause, M., Laschinsky, L., Leßmann, E., Nicolai, M., Reuter, M., Richter, C., Sävert, A., Schnell, M., Schürer, M., Woithe, J., Kaluza, M. & Pawelke, J. (2015). Comparison study of in vivo dose response to laser-driven versus conventional electron beam. *Radiat Environ Biophys.* 54, 155-166

Pantelouris, E. M. (1973). Athymic development in the mouse. *Differentiation.* 1(6), 437-450

Peña, L. A., BNL, Medical Department, Dilmanian, F. A., Zhong, N., Recksiek, F. P. & Bacarian, T. (2003). National Synchrotron Light Source Annual Activity Report 2002: Adaptation of Endothelium to Microlesions Created by X-ray Microbeam Irradiation (Peña0595). <https://www.bnl.gov/isd/documents/25005/Abstracts/pena0595.pdf>

Petersen, C., Eicheler, W., Frömmel, A., Krause, M., Balschukat, S., Zips, D., & Baumann, M. (2003). Proliferation and micromilieu during fractionated irradiation of human FaDu squamous cell carcinoma in nude mice. *International journal of radiation biology,* 79(7), 469–477

Petersen, J. F., Timmermans, A. J., van Dijk, B. A. C., Overbeek, L. I. H., Smit, L. A., Hilgers, F. J. M., Stuiver, M. M. & van den Brekel, M. W. M. (2018). Trends in treatment, incidence and survival of hypopharynx cancer: a 20-year population-based study in the Netherlands. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 275(1), 181-189

Pfister, D. G., Spencer, S., Adelstein, D., Adkins, D., Brizel, D.M., Bruce, J.Y., Busse, P.M., Caudell, J.J., Cmelak, A.J., Colevas, A.D., Eisele, D.W., Fenton, M., Foote, R.L., Galloway, T., Gillison, M.L., Haddad, R.I., Hicks, W.L., Hitchcock, Y.J., Jimeno, A., Leizman, D., Maghami, E., Mell, L.K., Mittal, B.B., Pinto, H.A., Ridge, J.A., Rocco, J.W., Rodriguez, C.P., Shah, J.P., Weber, R.S., Weinstein, G., Witek, M., Worden, F., Yom, S.S., Zhen, W., Burns, J., Darlow, S. & Anzai, Y. (2020). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Head and Neck Cancers. (Version 1.2020.). National Comprehensive Cancer Network. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#site 15.03.20

Pracy, P., Loughran, S., Good, J., Parmar, S. & Goranova, R. (2016). Hypopharyngeal cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol.* 130(S2), 104-110

Puck, T. T. & Marcus, P. I. (1955). A Rapid Method for Viable Cell Titration and Clone Production with HeLa Cells in Tissue Culture: The Use of X-Irradiated Cells to Supply Conditioning Factors. *Proc Nat Acad Sc USA.* 41(7), 432-437

- Puck, T. T., Marcus, P. I. & Cieciura, S. J. (1956). Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *J Exp Med.* 103(2), 273-283
- Rangan, S. R. S. (1972). A New Human Cell Line (FaDu) From A Hypopharyngeal Carcinoma. *Cancer.* 29(1), 117-121
- Regnard, P., Le Duc, G., Bräuer-Krisch, E., Tropès, I., Siegbahn, E. A., Kusak, A., Clair, C., Bernard, H., Dallery, D., Laissue, J. A. & Bravin, A. (2008). Irradiation of intracerebral 9L gliosarcoma by a single array of microplanar x-ray beams from a synchrotron: balance between curing and sparing. *Phys Med Biol.* 53(4), 861-878
- Reiss, M., Brash, D. E., Muñoz-Antonia, T., Simon, J. A., Ziegler, A., Vellucci, V. F., & Zhou, Z. L. (1992). Status of the p53 tumor suppressor gene in human squamous carcinoma cell lines. *Oncology research,* 4(8-9), 349–357
- Renier, M., Brochard, T., Nemoz, C. & Thomlinson, W. (2002). A white-beam fast-shutter for microbeam radiation therapy at the ESRF. *Nucl Instrum Meth Phys Res A.* 479(2), 656-660
- Rieckmann, T., Tribius, S., Grob, T. J., Meyer, F., Busch, C. J., Petersen, C., Dikomey, E., & Kriegs, M. (2013). HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology,* 107(2), 242–246
- Ried, T., Schröck, E., Ning, Y. & Wienberg, J. (1998). Chromosome painting: a useful art. *Hum Mol Genet.* 7(10), 1619-1626
- Röntgen, W. C. (1896). On a new kind of rays. *Science.* 3(59), 227-231
- Rui, T. & Huang, W. (2018). Lattice design and beam dynamics of a storage ring for a Thomson scattering x-ray source. *Phys. Rev. Accel. Beams.* 21, 100101
- Rygaard, J. & Povlsen, C. O. (1969). Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 77(4), 758-760
- Sakanaka, S., Adachi, M., Adachi, S., Akagi, T., Akemoto, M., Arakawa, D., Araki, S., Asaoka, S., Enami, K., Endo, K., Fukuda, S., Furuya, T., Haga, K., Hara, T., Harada, K., Honda, T., Honda, Y., Honma, H., Honma, T. & Hwang, J.-G. (2015, Mai). Recent Progress and Operational Status of the Compact ERL at KEK [Paper]. 6th International Particle Accelerator Conference (IPAC'15), Richmond, Virginia, USA.

- Santivasi, W. L. & Xia, F. (2014). Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxid Redox Signal*. 21(2), 251-259
- Sato, K., Shimokawa, T., & Imai, T. (2019). Difference in Acquired Radioresistance Induction Between Repeated Photon and Particle Irradiation. *Frontiers in oncology*, 9, 1213
- Schreiber, E. C. & Chang, S. X. (2012). Monte Carlo simulation of a compact microbeam radiotherapy system based on carbon nanotube field emission technology. *Med Phys*. 39(8), 4669-4678
- Serduc, R., Vérant, P., Vial, J. C., Farion, R., Rocas, L., Rémy, C., Fadlallah, T., Bräuer-Krisch, E., Bravin, A., Laissue, J., Blattmann, H. & Van Der Sanden, B. (2006). In vivo two-photon microscopy study of short-term effects of microbeam irradiation on normal mouse brain microvasculature. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 64(5), 1519-1527
- Serduc, R., Christen, T., Laissue, J., Farion, R., Bouchet, A., Van Der Sanden, B., Segebarth, C., Brauer-Krisch, E., Le Duc, G., Bravin, A., Remy, C. & Barbier, E. L. (2008). Brain tumor vessel response to synchrotron microbeam radiation therapy: a short-term in vivo study. *Phys Med Biol*. 53(13), 3609-3622
- Serduc, R., Bouchet, A., Bräuer-Krisch, E., Laissue, J. A., Spiga, J., Sarun, S., Bravin, A., Fonta, C., Renaud, L., Boutonnat, J., Siegbahn, E. A., Estève, F. & Le Duc, G. (2009). Synchrotron microbeam radiation therapy for rat brain tumor palliation-influence of the microbeam width at constant valley dose. *Phys Med Biol*. 54(21), 6711-6724
- Sewnaik, A. & Baatenburg de Jong, R. J. (2019). Sequelae and Complications of Treatment for Hypopharyngeal Cancer: Minimising the Risks. *Adv Otorhinolaryngol*. 83, 109-117
- Sewnaik, A., Hoorweg, J. J., Knecht, P. P., Wieringa, M. H., van der Beek, J. M. & Kerrebijn, J. D. (2005) Treatment of hypopharyngeal carcinoma: analysis of nationwide study in the Netherlands over a 10-year period. *Clin Otolaryngol*. 30(1), 52-57
- Shah, J. P., Shaha, A. R., Spiro, R. H. & Strong, E. W. (1976). Carcinoma of the hypopharynx. *Am J Surg*. 132, 439-443
- Siegbahn, E. A., Stepanek, J., Bräuer-Krisch, E. & Bravin, A. (2006). Determination of dosimetrical quantities used in microbeam radiation therapy (MRT) with Monte Carlo simulations. *Med Phys*. 33(9), 3248-3259

- Sims, E., Doughty, D., Macaulay, E., Royle, N., Wraith, C., Darlison, R. & Plowman, P. N. (1999). Stereotactically delivered cranial radiation therapy: a ten-year experience of linac-based radiosurgery in the UK. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 11(5), 303-320
- Slatkin, D. N., Spanne, P. O., Dilmanian, F. A. & Sandborg, M. (1992). Microbeam radiation therapy. *Med. Phys.* 19, 1395–1400
- Slatkin, D. N., Dilmanian, F. A. & Spanne, P. O. (1994). Method for microbeam radiation therapy (U.S. Patent 5339347 A). United States Patent and Trademark Office.
- Slatkin, D. N., Spanne, P. O., Dilmanian, F. A., Gebbers, J. O. & Laissue, J. A. (1995). Subacute neuropathological effects of microplanar beams of x-rays from a synchrotron wiggler. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 92(19), 8783-8787
- Smilowitz, H. M., Blattmann, H., Bräuer-Krisch, E., Bravin, A., Di Michiel, M., Gebbers, J. O., Hanson, A. L., Lyubimova, N., Slatkin, D. N., Stepanek, J. & Laissue, J. A. (2006). Synergy of gene-mediated immunoprophylaxis and microbeam radiation therapy for advanced intracerebral rat 9L gliosarcomas. *J Neurooncol.* 78(2), 135-143
- Smith, R. W., Wang, J., Schültke, E., Seymour, C. B., Bräuer-Krisch, E., Laissue, J. A., Blattmann, H. & Mothersill, C. E. (2013). Proteomic changes in the rat brain induced by homogenous irradiation and by the bystander effect resulting from high energy synchrotron X-ray microbeam. *Int J Radiat Biol.* 89(2), 118-127
- Smyth, L., Crosbie, J. C., Senthil, S. & Rogers, P. A. W. (2016). The normal tissue effects of microbeam radiotherapy: What do we know, and what do we need to know to plan a human clinical trial? *Int J Rad Biol.* 92(6), 1-10
- Soder, A. I., Hopman, A. H., Ramaekers, F. C., Conradt, C., & Bosch, F. X. (1995). Distinct nonrandom patterns of chromosomal aberrations in the progression of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer research*, 55(21), 5030–5037.
- Somers, K., Merrick, M., López, M., Incognito, L.S., Schechter, G.L., & Casey, G. (1992). Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer research*, 52 21, 5997-6000
- Sprung, C. N., Yang, Y., Forrester, H. B., Li, J., Zaitseva, M., Cann, L., Restall, T., Anderson, R. L., Crosbie, J. C. & Rogers, P. A. (2012). Genome-wide transcription responses to synchrotron microbeam radiotherapy. *Radiat Res.* 178(4), 249-259
- Stern, Z. (o. J.). CIX2. Xstrahl Medical & Life Sciences. Abgerufen 21.10.2020 von <https://xstrahl.com/de/life-science-systems/cix2>

Stewart, W. & Wild, C. P. (2014). IARC Publications Website - World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Abgerufen 25.03.2020 von <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>

Suit, H., Lindberg, R. & Fletcher, G. H. (1965). Prognostic significance of extent of tumour regression at completion of radiation therapy. *Radiology*. 84, 1100-1107

Swinger, R. R. & Tucker, J. D. (1996). Fluorescence in situ hybridization: a brief review. *Environ Mol Mutagen*. 27(4), 245–254

Szadvari, I., Krizanova, O. & Babula, P. (2016). Athymic Nude Mice as an Experimental Model for Cancer Treatment. *Physiol. Res*. 65(Suppl. 4), 441-453

Takes, R. P., Strojjan, P., Silver, C. E., Bradley, P. J., Haigentz, M., Jr., Wolf, G. T., Shaha, A. R., Hartl, D. M., Olofsson, J., Langendijk, J. A., Rinaldo, A. & Ferlito, A. (2012). Current trends in initial management of hypopharyngeal cancer: the declining use of open surgery. *Head Neck*. 34(2), 270-281

Themes, U. (2016). Factors affecting X-ray beam quality and quantity. *Radiology Key*. Abgerufen 21.10.2020 von <https://radiologykey.com/factors-affecting-x-ray-beam-quality-and-quantity/>

Thomlinson, R. H. & Craddock, E. A. (1967). The gross response of an experimental tumour to single doses of X-rays. *Br. J. Cancer*. 21(1), 108-123

Thomlinson, W., Berkvens, P., Berruyer, G., Bertrand, B., Blattmann, H., Bräuer-Krisch, E., Brochard, T., Charvet, A. M., Corde, S., Dimichiel, M., Elleaume, H., Estève, F., Fiedler, S., Laissue, J.A., Le Bas, J. E., Le Duc, G., Lyubimova, N., Nemoz, C., Renier, M., Slatkin, D. N., Spanne, P. O. & Suortti, P. (2000). Research at the European Synchrotron Radiation Facility medical beamline. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 46(6), 1053-1063

Torsvik, A., Stieber, D., Enger, P. Ø., Golebiewska, A., Molven, A., Svendsen, A., Westermark, B., Niclou, S. P., Olsen, T. K., Chekenya Enger, M., & Bjerkvig, R. (2014). U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells. *Cancer medicine*, 3(4), 812–824

Tsou, Y. A., Lin, M. H., Hua, C. H., Tseng, H. C., Chen, S. W., Yang, S. N., Liang, J. A. & Tsai, M. H. (2007). Survival outcome by early chemoradiation therapy salvage or early surgical salvage for the treatment of hypopharyngeal cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 137(5), 711-716

- Urban, T. (2017). Dosimetric Characterization of Microbeams for Preclinical Experiments in Radiotherapy at the Munich Compact Light Source. (Master's thesis Physik). Fakultät für Physik, Technische Universität München.
- Van Der Sanden, B., Bräuer-Krisch, E., Siegbahn, E. A., Ricard, C., Vial, J. C. & Laissue, J. (2010). Tolerance of arteries to microplanar X-ray beams. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 77(5), 1545-1552
- Variola, A. (2011, September). The ThomX Project. 2nd International Particle Accelerator Conference (IPAC'11), San Sebastian, Spanien.
- Variola, A., Haissinski, J., Loulergue, A. & Zomer, F. (Hrsg.). (2014). ThomX Technical Design Report. http://hal.in2p3.fr/file/index/docid/971281/filename/TDR_ThomX.pdf
- Vasquez, J. L., Lai, Y., Annamalai, T., Jiang, Z., Zhang, M., Lei, R., Zhang, Z., Liu, Y., Tse-Dinh, Y. C., & Agoulnik, I. U. (2020). Inhibition of base excision repair by natamycin suppresses prostate cancer cell proliferation. *Biochimie*, 168, 241–250
- Watanabe, I., & Okada, S. (1967). Effects of temperature on growth rate of cultured mammalian cells (L5178Y). *The Journal of cell biology*, 32(2), 309–323
- WHO. (2018). Cancer. World Health Organization. Abgerufen 23.03.2020 von <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Wild, C. P., Weiderpass, E. & Stewart, B. W. (Hrsg.). (2020). World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. International Agency for Research on Cancer, Lyon. Abgerufen 26.03.2020 von <http://publications.iarc.fr/586>
- Withers, H. R., Taylor, J. M. & Maciejewski, B. (1988). Treatment volume and tissue tolerance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 14(4), 751-759
- Withers, H. R., Taylor, J. M., & Maciejewski, B. (1988). The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 27(2), 131–146
- Wong, P. C., Dodd, M. J., Miaskowski, C., Paul, S. M., Bank, K. A., Shiba, G. H. & Facione, N. (2006). Mucositis pain induced by radiation therapy: prevalence, severity, and use of self-care behaviors. *J Pain Symptom Manage.* 32(1), 27-37
- Wright, M. D. (2015). Microbeam radiosurgery: An industrial perspective. *Physica Medica.* 31, 601-606

Wu, H., Durante, M., Sachs, R. K. & Yang, T. C. (1997). Centric rings, acentric rings and excess acentric fragments based on a random-walk interphase chromosome model. *Int J Radiat Biol.* 71(5), 487 - 496

Yu, H., Liu, N., Wang, H., Shang, Q., Jiang, P., & Zhang, Y. (2013). Different responses of tumor and normal cells to low-dose radiation. *Contemporary oncology (Poznan, Poland)*, 17(4), 356–362

Yuan, H., Zhang, L., Frank, J. E., Inscoe, C. R., Burk, L. M., Hadsell, M., Lee, Y. Z., Lu, J., Chang, S., & Zhou, O. (2015). Treating Brain Tumor with Microbeam Radiation Generated by a Compact Carbon-Nanotube-Based Irradiator: Initial Radiation Efficacy Study. *Radiation research*, 184(3), 322–333

Zeman, W., Curtis, H. J., Gebhard, E. L. & Haymaker, W. (1959). Tolerance of mouse-brain tissue to high-energy deuterons. *Science*. 130(3391), 1760-1761

Zentrum für Krebsregistrierdaten & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2019). *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. 12. Ausgabe. Robert Koch Institut. Abgerufen 25.03.2020 von https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile

Zhang, L., Yuan, H., Inscoe, C., Chtcheprov, P., Hadsell, M., Lee, Y., Lu, J., Chang, S. & Zhou, O. (2014). Nanotube x-ray for cancer therapy: a compact microbeam radiation therapy system for brain tumor treatment. *Expert Rev Anticancer Ther.* 14(12), 1411-1418

Zhang, X., Wang, J., Li, X., & Wang, D. (2018). Lysosomes contribute to radioresistance in cancer. *Cancer letters*, 439, 39–46

Zhong, N., Morris, G. M., Bacarian, T., Rosen, E. M. & Dilmanian, F. A. (2003). Response of Rat Skin to High-Dose Unidirectional X-Ray Microbeams: A Histological Study. *Radiat Res.* 160(2), 133-142