

10 ATO0185

SGAE BER. No. 3049

BL-275/79

JULI 1979

Belegexemplar

HAUPTVERLAGSSTELLE
Österreichische Studiengesellschaft
für Atomenergie Ges. m. b. H.
Forschungszentrum: Hahn Center
A-2444 SEIBERSDORF
Tel. 02254-80/23 12

Berichte der
Österreichischen Studiengesellschaft
für Atomenergie Ges. m. b. H.

Forschungszentrum Seibersdorf

ÜBER DEN EINFLUSS EINER ZYTOSTATIKATHERAPIE UND EINER
PERCUTANEN STRAHLENTHERAPIE AUF DIE DNA-REPARATUR
PERIPHERER LYMPHOZYTEN VON TUMORPATIENTEN

WOLFGANG KLEIN
GERHARD ALTH
HELGARD KLEIN
HANS KOREN

ÜBER DEN EINFLUSS EINER ZYTOSTATIKATHERAPIE UND EINER
PERCUTANEN STRAHLENTHERAPIE AUF DIE DNA-REPARATUR
PERIPHERER LYMPHOZYTEN VON TUMORPATIENTEN

Wolfgang KLEIN +
Gerhart ALTH +
Helgard KLEIN +
Hans KOREN +

Erscheint in "Strahlentherapie"

Österreichische
Studiengesellschaft für Atomenergie
Ges.m.b.H.
Lenaugasse 10 A-1082 Wien

INSTITUT FÜR BIOLOGIE
Forschungszentrum Seibersdorf

+ Sonderabteilung für Strahlentherapie bzw. Ludwig
Roltzmann Institut für klinische Onkologie im
Krankenhaus der Stadt Wien - Lainz

ÜBER DEN EINFLUSS EINER ZYTOSTATIKATHERAPIE UND EINER
PERCUTANEN STRAHLENTHERAPIE AUF DIE DNA-REPARATUR
PERIPHERER LYMPHOZYTEN VON TUMORPATIENTEN=====

KURZFASSUNG

An 10 Patienten mit malignen Erkrankungen wurde der Einfluß der percutanen Strahlentherapie, an weiteren 5 Patienten der Einfluß einer Zytostatikatherapie auf die DNA-Reparaturkapazität peripherer Lymphozyten untersucht. Es zeigte sich, daß die ausschließliche Bestrahlung mit einem Kreibeschleuniger bzw. mit einer Telekobalteinheit unter Verwendung normaler Tiefenbestrahlungsmodalität in den meisten Fällen keine Veränderung im Ausmaß der DNA-Reparatur bewirkte, allerdings eine Kombination der beiden Bestrahlungsarten eine Hemmung der DNA-Reparatur zur Folge hatte. Unter Zytostatikatherapie war zu Beginn eine starke Hemmung der DNA-Reparatur zu beobachten, die aber nach relativ kurzer Zeit in eine Erhöhung überging.

Schlüsselwörter: DNA-Reparatur, Tumor, Strahlen- bzw. Chemotherapie, Lymphozyten

THE INFLUENCE OF RADIO- AND CHEMOTHERAPY ON DNA REPAIR
OF PERIPHERAL LYMPHOCYTES OF TUMOR PATIENTS=====

ABSTRACT

The influence of radiotherapy and chemotherapy, respectively, on DNA excision repair was investigated in lymphocytes of the peripheral blood of 10 and 5 patients with malignancies. No effects on DNA repair were found using only betatrone or ⁶⁰Co-irradiation under normal conditions. Combination of both irradiation schedules over a longer period of therapy provoked an inhibition of DNA repair. Chemotherapy inhibits DNA repair immediately after starting therapy, but after relatively short time, the extent of DNA repair increases above normal level.

Key words: DNA repair, tumor, radio- and chemotherapy, lymphocytes

ÜBER DEN EINFLUSS EINER ZYTOSTATIKATHERAPIE UND EINER
PERCUTANEN STRAHLENTHERAPIE AUF DIE DNA-REPARATUR
PERIPHERER LYMPHOZYTEN VON TUMORPATIENTEN

EINLEITUNG

Die Frage nach einer Beeinflussung der Reparatur der Desoxyribonukleinsäure (DNA) gesunder Zellen durch die Strahlentherapie wurde in ihrer Bedeutung für die Integrität des genetischen Materials bereits in einer vorangegangenen Arbeit (1) aufgeworfen. Dabei wurde hauptsächlich die Wirkung einer hochdosierten ^{60}Co -Kurzzeitbestrahlung durch das TEM-Cathetron bzw. einer Radiumbestrahlung unterschiedlicher Integraldosis auf das Ausmaß der DNA-Reparatur von Lymphozyten des peripheren Blutes untersucht. Die dabei nachgewiesenen bedeutenden Schwankungen der DNA-Reparatur konnten überwiegend auf Integraldosis, Dosisleistung bzw. Applikationsdauer der Strahlung zurückgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit soll nun auch die Auswirkung der percutanen Strahlentherapie mit Telehochenergiegeräten über mehrere Wochen der Therapie deutlich gemacht werden. Vergleichend dazu wurde das Ausmaß der DNA-Reparatur während einer Zytostatikatherapie verfolgt.

KRANKENGUT UND METHODIK

Krankengut: Zur Untersuchung wurden fünfzehn Karzinompatienten herangezogen, die folgende Karzinomlokalisationen aufwiesen: Sieben Patienten ein Mammakarzinom, je zwei ein Blasen- bzw. Portiokarzinom, je ein Patient ein

Bronchuskarzinom bzw. ein Hypernephrom, ein Patient eine Metastase nach operiertem Nierenkarzinom und eine Patientin eine Drüsenmetastase in der linken Leiste nach einer Wertheimoperation.

Bei den zehn radiotherapeutisch behandelten Patienten wurde mit einer Ausnahme eine Mehrfeldtechnik angewendet.

Beim Mammakarzinom wurde eine Vielfelder methode unter Einschluß eines sternalen Pendelfeldes angewendet, wobei folgende Modalitäten zum Tragen kamen: Mit einem Telekobaltgerät wurden opponierende Felder unter Einschluß der supraclaviculären und axillären Regionen vorgenommen, wobei die Einzeldosis 350 R an der Körperoberfläche mit ungefähr 250 R am Herd betrug. Die Thoraxwand wurde mit schnellen Elektronen einer Energie von 10 meV unter Vorspannen eines 1 cm starken Plexiglasses zur Isodosenanhebung an der Thoraxwand behandelt. Das sternale Pendelfeld (6 x 16 cm) mit dem Pendelmittelpunkt an der Thoraxoberfläche zur Abflachung der Isodosen gegen die Tiefe wurde mit jeweiligen Einzelherddosen (EHD) von 270 R bestrahlt.

Die übrigen Patienten erhielten regionär bezogene Bestrahlungsfelder mittels Mehr- und Stehfeldtechnik, wobei fakultativ schnelle Elektronen verschiedener Energie und eine Telekobalttherapie zum Einsatz kamen.

Bei den chemotherapeutisch behandelten Patienten wurden folgende Zytostatika in wechselnder bzw. vorgegebener Kombination verwendet: Bleomycin, Adriamycin (Adriblastin^R), Vincristinsulfat (Oncovin^R), Cyclophosphamid (Endoxan^R), 5-Fluorouracil (5 FU) und Methotrexat (MTX).

TABELLE: Diagnosestellung und Therapie der Patienten

Geschlecht	Therapie	
Alter	B (Betatron)	
Diagnose	K (Telekobalt)	
=====		
A. m, 67a vesicae Ca.	B: 175R EOD, 350R EHD 3325R GOD, 6650R GHD	während 45 Tagen

B. f, 63a Hypernephrom	B: 350R EOD, 298R EHD 5600R GOD, 4904R GHD auf 2 Felder 10x12cm	während 25 Tagen
C. m, 77a vesicae Ca.	B: 300R EOD, 228R EHD 8100R GOD, 5940R GHD auf 3 Felder 8x10, 10x12cm	während 32 Tagen
D. f, 78a portionis Ca.	K: 300R EOD, 133R, 155R EHD 13200R GOD, 6336R GHD auf 4 Felder 6x16cm	während 26 Tagen
E. f, 63a portionis Ca.	K: 300R EOD, 135R, 155R EHD 14400R GOD, 6960R GHD auf 4 Felder 6x16cm	während 29 Tagen
F. m, 66a bronchi Ca.	B: 100R, 200R, 300R EOD=EHD 7500R GOD=GHD auf 2 Felder 6x16cm K: 100R EOD, 74R EHD 2600R GOD, 1924R GHD auf 2 Felder 10x10cm	während 34 Tagen
G. f, 72a mammae Ca.	B: 450R EOD=EHD 4050R GOD=GHD auf 1 Feld 12x14cm K: 278R EOD=EHD 350R EOD, 250R EHD 9492R GOD, 7892R GHD auf 3 Felder 8x18, 6x10cm	während 44 Tagen
H. f, 41a mammae Ca.	B: 450R EOD=EHD 5850R GOD=GHD auf 1 Feld 10x12cm K: 278R EOD 350R EOD, 250R EHD 14270R GOD, 11870R GHD auf 3 Felder 6x16, 8x18cm	während 50 Tagen während 63 Tagen
I. f, 67a mammae Ca.	B: 450R EOD=EHD 5850R GOD=GHD auf 1 Feld 12x14cm K: 278R EOD=EHD 350R EOD, 250R EHD 14238R GOD, 11838R GHD auf 3 Felder 6x16, 8x18cm	während 57 Tagen
J. f, 34a mammae Ca.	B: 450R EOD=EHD 5850R GOD=GHD auf 1 Feld 12x14cm K: 278R EOD=EHD 350R EOD, 250R EHD 14238R GOD, 11838R GHD auf 3 Felder 6x16, 8x18cm	während 56 Tagen während 71 Tagen

Geschlecht Therapie
Alter Z (Zytostatika)
Diagnose
=====

K. f, 56a Z: Bleomycin
 Drüsenmeta.(Leiste) 3 x 15 mg

L. f, 67a Z: Oncovin
 Niere re, op. 2 x 1 Ampulle

M. f, 67a
 mammas Ca. Z: Adriamycin 60 mg
 Oncovin 1 Ampulle
 jeweils 2 x

N. f, 65a
 mammas Ca. Z: Oncovin 1,1 mg/m²
 Endoxan 423,0 mg/m²
 5 FU 423,0 mg/m²
 MTX 17,6 mg/m²
 3 Infusionen

O. f, 46a
 mammas Ca. Z: Oncovin 1,1 mg/m²
 Endoxan 423,0 mg/m²
 5 FU 423,0 mg/m²
 MTX 17,6 mg/m²
 3 Infusionen

EOD = Einzeloberflächendosis
EHD = Einzelherddosis
GOD = Gesamtoberflächendosis
GHD = Gesamtherddosis

Methodik: Den Patienten wurde vor der Therapie - als
Bezugskontrollwert - während der Behandlung und - soweit
möglich - nach Ende der Therapie Blut abgenommen und mit
Heparin zur Gerinnungshemmung versetzt. Die Lymphozyten
wurden durch eine Ficoll-Urografin-Trennung (2) isoliert,
einmal mit Periston N und zweimal mit HANKS-Medium (3)
gewaschen. Im gleichen Medium wurden die Zellen anschlies-
send suspendiert und für die Untersuchungen verwendet.

Die Lymphozytensuspension wurde zur Unterdrückung der semi-
konservativen DNA-Synthese während 30 Minuten bei 37°C

mit Hydroxyharnstoff (Endkonzentration $10^{-2}M$) vorinkubiert. Danach wurde in einem Teil der Probe ein gezielter Schaden an der DNA der Zellen mit UV-Strahlung (254 nm, $20 J/m^2$) gesetzt. Durch Inkubation mit der Tritium markierten DNA-Vorstufe Thymidin (NEN, spez. Akt. 50 Ci/mMol) unmittelbar nach der Schadenssetzung über 90 Minuten bei $37^{\circ}C$ konnte die Einbaurrate für die bestrahlte Probe im Vergleich zur Unbestrahlten ermittelt werden, wobei der Einbau mit Perchlorsäure (PCS - Endkonzentration 6%) gestoppt und das nicht eingebaute 3H -Thymidin mit 6%iger PCS ausgewaschen wurde. Anschließend wurde die DNA bei $90^{\circ}C$ in 6%iger PCS hydrolysiert und in aliquoten Teilen des durch Zentrifugation gewonnenen Überstandes die DNA-Menge nach BURTON (4) und die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (5) gemessen.

Die Ergebnisse wurden als spezifische Aktivität, d.h. Impulse/Minute pro μg DNA, errechnet und die bestrahlte zur unbestrahlten Probe in Relation gesetzt. Über den Verlauf der Therapie wurden die Werte in Prozenten des Bezugskontrollwerts angegeben.

ERGEBNISSE

Die Behandlung mit schnellen Elektronen zeigte bei den Patienten A, B und C keine Wirkung auf das Ausmaß der DNA-Reparatur der Lymphozyten des peripheren Blutes. Wie aus Abbildung 1 zu ersehen ist, kommt es nur zu geringen Abweichungen vom Anfangswert der DNA-Reparatur vor der Therapie.

Bei den Patienten D und E zeigt die percutan über das Telekobaltgerät applizierte Gamma-Strahlung während der Therapie eher einen gesteigerten DNA-Reparatureinbau in die DNA der peripheren Lymphozyten (Abbildung 2).

Nicht so einheitlich ist das Ergebnis, wenn die Behandlung mit schnellen Elektronen durch percutane Gamma-Strahlung ergänzt wird. Von fünf Patienten zeigt sich lediglich bei

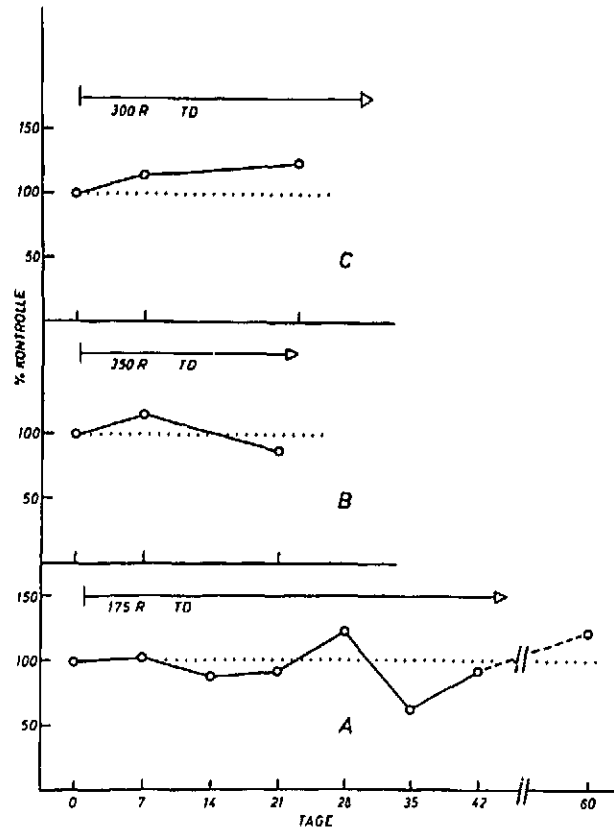


ABBILDUNG 1: DNA-Exzisionsreparatur in den Lymphozyten des peripheren Blutes (o o) während der Bestrahlung mit schnellen Elektronen
 Bezugskontrollwerte absolut: Patient A 112, Patient B 71 und Patient C 286.

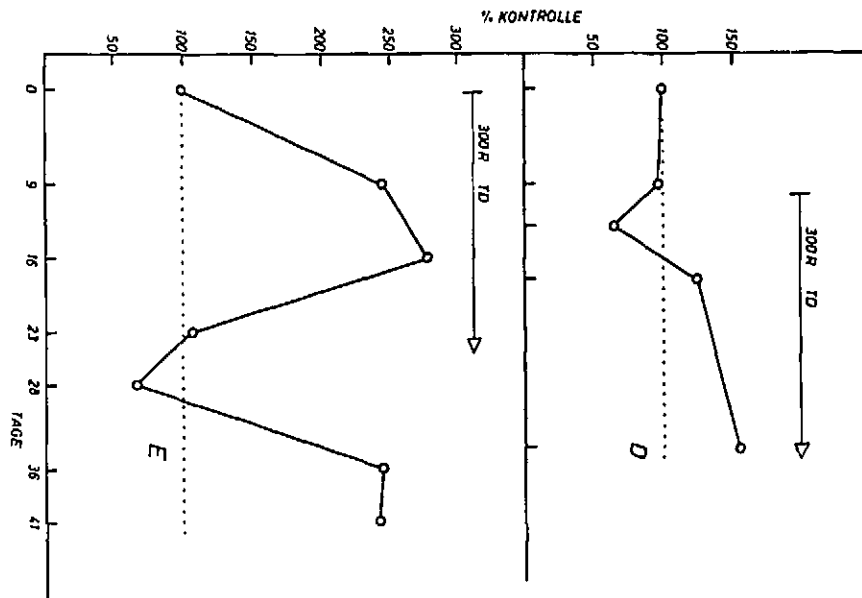


ABBILDUNG 2: DNA-Exzisionsreparatur in den peripheren Blutlymphozyten (o o) während der Bestrahlung mit dem Telekobaltgerät
 Bezugskontrollwerte absolut (0 Tage): Patient D 80 und Patient E 112.

Patient F eine gegenüber dem Anfangswert vor der Therapie nahezu unveränderte DNA-Exzisionsreparatur in den Lymphozyten während der gesamten Behandlungsdauer. Bei den Patienten G, H, I und J kommt es durch die kombinierte Behandlung zu einer deutlichen Unterdrückung der DNA-Exzisionsreparatur der peripheren Lymphozyten, wobei bei Patient J diese Unterdrückung erst nach fünf Wochen der Therapie einsetzt. Auch die zwei Monate nach Absetzen der Behandlung ermittelten DNA-Reparaturwerte liegen bei drei Patienten noch deutlich unter dem Ausgangswert der DNA-Exzisionsreparatur vor der Therapie (Abbildung 3).

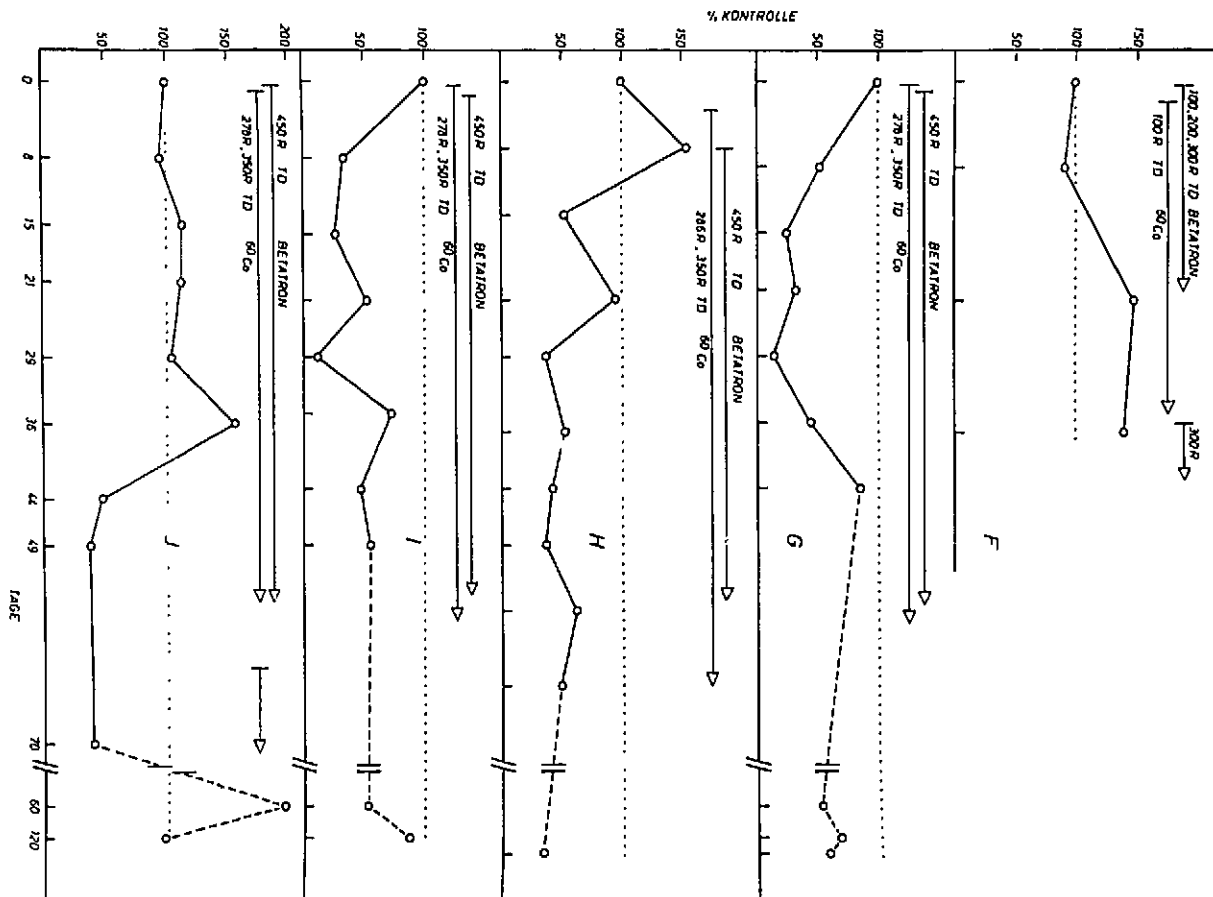


ABBILDUNG 3: DNA-Exzisionsreparatur in den Lymphozyten des peripheren Blutes (o o) während der Bestrahlung mit dem Telekobaltgerät und mit schnellen Elektronen (Betatron).
 Bezugskontrollwerte absolut (0 Tage): Patient F 119, Patient G 374, Patient H 242, Patient I 328 und Patient J 172.

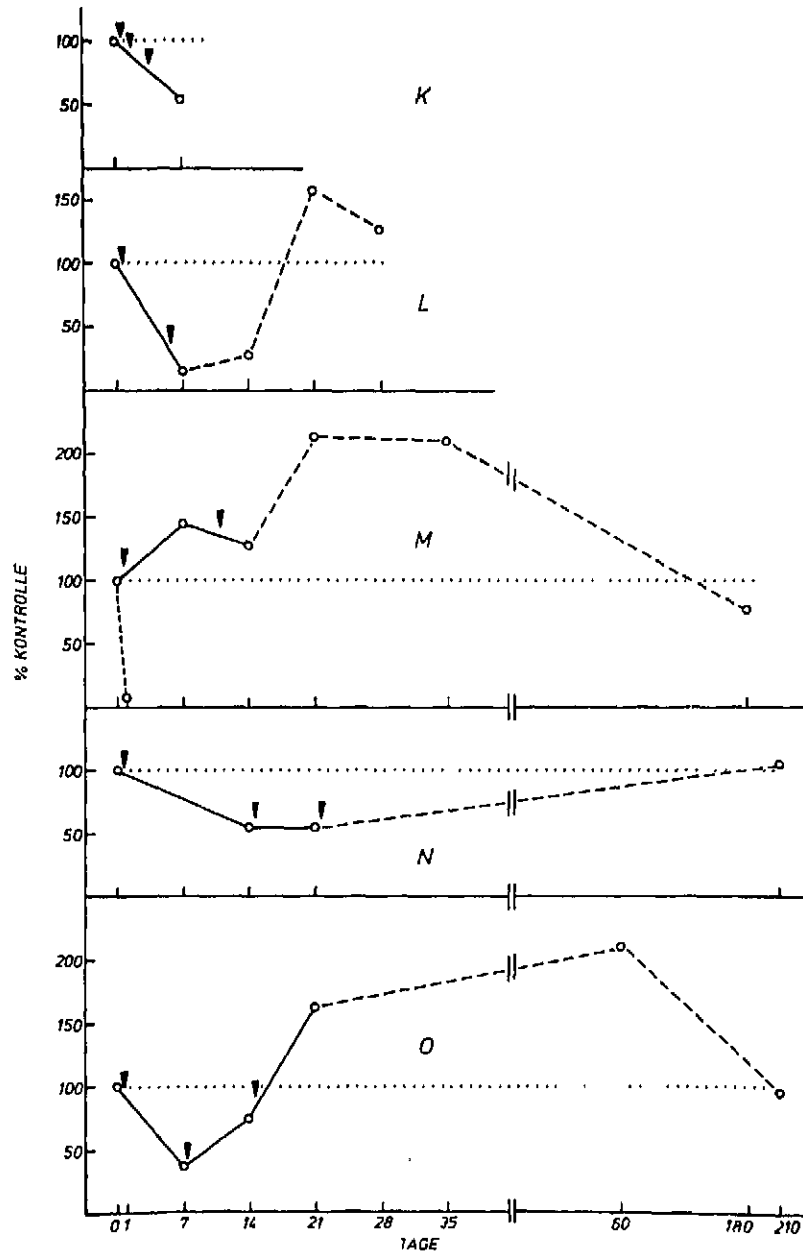


ABBILDUNG 4: DNA-Exzisionsreparatur in den Lymphozyten des peripheren Blutes (o o) während der Behandlung mit Zytostatika (▲). Unmittelbare Wirkung des Zytostatikums (----o, Pat.M). Bezugskontrollwerte absolut (0 Tage): Patient K 243, Patient L 194, Patient M 127, Patient N 124 und Patient O 105.

Die Behandlung mit Zytostatika bewirkt generell eine starke Hemmung der DNA-Reparatur der peripheren Lymphozyten nach den ersten Verabreichungen der Medikamente, sei es nun durch Bleomycin (Patient K) und Oncovin (Patient L) als monozytostatische Therapie, oder durch

Adriamycin und Oncovin (Patient M), bzw. Oncovin, Endoxan, 5 FU und MTX (Israel Schema, Patienten N, O) als polyzytostatische Therapieform. Bei Patient N blieb die DNA-Reparatur der peripheren Lymphozyten während der Therapie unterdrückt, erreichte aber nach Absetzen der Therapie wieder den Ausgangswert, der vor der Behandlung gemessen wurde. Bei den Patienten L, M und O kam es noch während der Therapie zu einem gesteigerten DNA-Exzisionsreparatureinbau über den Bezugskontrollwert hinaus. Dieser Anstieg erfolgte bei Patient M nach einer Woche, bei Patient O nach zwei und bei Patient L nach drei Wochen. Bei Patient L wurde das erhöhte Ausmaß der DNA-Reparatur allerdings erst zwei Wochen nach der letzten Zytostatikagabe beobachtet, während es bei den Patienten M und O trotz weiterer Zytostatikabehandlung auftrat. Patient O zeigte zwei Monate nach Ende der Therapie einen immer noch deutlich erhöhten DNA-Reparatureinbau gegenüber dem Bezugskontrollwert (Abbildung 4).

DISKUSSION

Im Vergleich zu anderen Bestrahlungsformen scheinen Tiefentherapien mit auch höheren Integraldosen, wie z.B. die lokale Harnblasenbestrahlung, allerdings wie bei unserem Krankengut ohne paravertebrale Lymphknotenfelder (Patienten A und C), keine weitreichende Beeinträchtigung des DNA-Exzisionsreparaturmechanismus der Zellen gegenüber der schädigenden Noxe hervorzurufen. Daher resultiert aus der Behandlung keine Unterdrückung der DNA-Reparatur der peripheren Lymphozyten.

Die Kombination der Bestrahlung mit schnellen Elektronen und ^{60}Co -Teletherapie scheint die Anpassung des DNA-Reparatursystems an diese Noxe deutlich zu beeinträchtigen. Sieht man von Patient F ab, der allerdings mit einer um das drei- bzw. vierfache geringeren Dosis bestrahlt worden ist, zeigt sich bei allen anderen

Patienten eine deutliche Unterdrückung der DNA-Exzisionsreparatur, wobei diese Hemmung bei den jüngeren Patienten J (34a) und H (41a) erst nach 5 bzw. 3 Wochen der Therapie einsetzt. Bei den älteren Patienten G (72a) und I (67a) ist dagegen die Unterdrückung der DNA-Reparatur ab der ersten Behandlungswoche in Relation zur Bezugskontrolle vor der Therapie deutlich ausgeprägt. Die Abhängigkeit der DNA-Reparaturkapazität vom Alter der Patienten scheint die Annahme zu bestätigen, daß alternde Zellen eine verminderte Reparaturfähigkeit besitzen (6).

Die Chemotherapie verursachte an unserem Krankengut bereits nach der ersten Verabreichung des jeweiligen Zytostatikums eine deutliche Hemmung der DNA-Reparatur in den peripheren Lymphozyten. Diese Hemmung erscheint durch die Tatsache, daß Zytostatika über Alkylierung bzw. Strangbrüche sowohl Schäden an der DNA setzen, als auch gleichzeitig als Hemmer die Reparatur dieser Schäden verzögern bzw. verhindern können (7,8,9,10), durchaus plausibel. Nach Absetzen der Therapie wurde eine Steigerung der Reparaturkapazität der peripheren Lymphozyten beobachtet. Dies könnte damit zusammenhängen, daß über die Reparatur dieser Strangbrüche bzw. eine zusätzliche Induktion von Reparaturenzymen (11) nach Absetzen der hemmenden Agentien ein gesteigerter Reparaturoinbau bewirkt wird.

In den hier beschriebenen Vorversuchen zeigt sich, daß höhere Integraldosen und die Erfassung großflächiger Areale am Körperstamm, wie es bei der postoperativen Mamma-Bestrahlung der Fall ist, meist eine Hemmung bzw. Unterdrückung der DNA-Reparatur provozieren. Auch die Kombination unterschiedlicher Strahlung führt, wie auch bereits früher beschrieben wurde (1), zu einer Unterdrückung der DNA-Reparatur. Die individuelle Norm im Ausmaß der DNA-Reparatur wird meist zwei bis acht Monate nach Beendigung der Therapie erreicht.

LITERATUR

1. ALTH G., KLEIN H., KOREN H., KLEIN W.:
Strahlentherapie 154, 44 (1978)
2. WOTTAWA A., KLEIN G., ALTMANN H.:
Wr.klin.Wschr. 86, 161 (1974)
3. HANKS H.J., WALLACE E.R.:
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 71, 196 (1949)
4. BURTON K.:
Biochem.J. 62, 315 (1956)
5. KOCSIS F., KLEIN W., ALTMANN H.:
Z.Naturforsch. 28c, 131 (1973)
6. NORMAN A.:
DNA-repair mechanisms, F.K.Schattauer Verlag, 1972
7. GAUDIN D., GREGG R.S., YIELDING K.L.:
Biochem.Biophys.Res.Comm. 45, 630 (1971)
8. ANON J.:
Cancer 37, 2062 (1976)
9. KLEIN W., KOCSIS F., ALTMANN H.:
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 25, 1623 (1975)
10. UMEZAWA H.:
Biomedicine 18, 459 (1973)
11. SARASIN A.R., HANAWALT P.C.:
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75, 346 (1978)

SGAE-Berichte: Eigentümer, Herausgeber, Verleger und Druck:
Österreichische Studiengesellschaft für Atomenergie Ges.m.b.H.
Nach dem Pressegesetz verantwortlich:
a.o. Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. Franz JEGLITSCH,
alle Lenaugasse 10, 1082 Wien, Tel. (0222) 42 75 11, Telex 7-5400

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor.