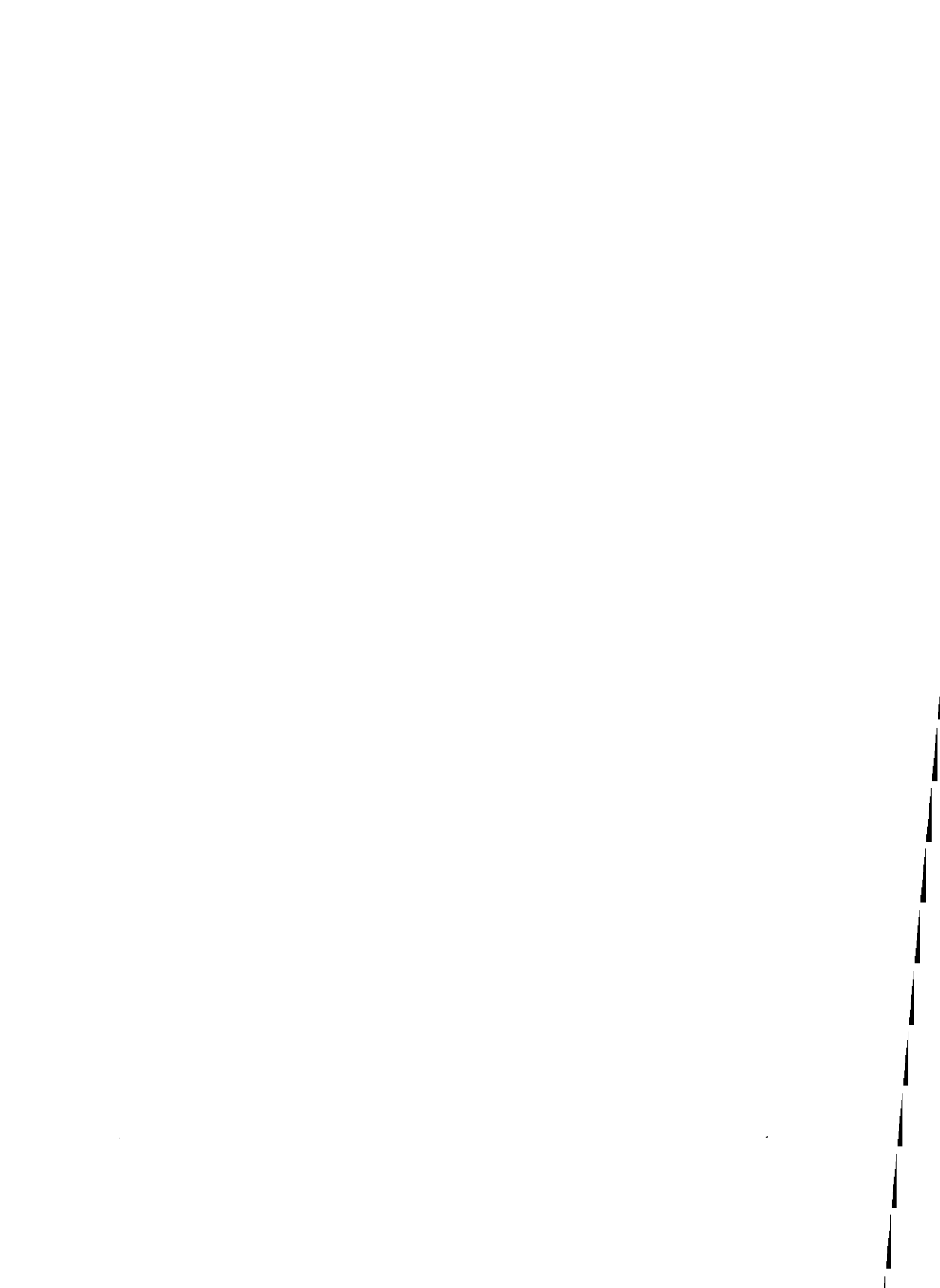


1969: 1

# STRALINGSGEVOELIGHEID VAN TUMOREN

Een experimenteel onderzoek bij de rat

H.S. Reinhold.



# STRALINGSGEVOELIGHEID VAN TUMOREN

Een experimenteel onderzoek bij de rat.

## PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad van doctor in de geneeskunde  
aan de Medische faculteit te Rotterdam, op gezag van de  
decaan Dr. A. Querido, hoogleraar in de faculteit der  
geneeskunde, tegen de bedenkingen van de faculteit der  
geneeskunde te verdedigen op 12 januari 1967 te 16 uur.

door

HUIBERT SOWDEN REINHOLD

geboren te Haarlem in 1928

Promotor: D.W. van Bakkum

Dit proefschrift werd bewerkt in het Radiobiologisch Instituut  
van de Gezondheidsorganisatie TNO.

Aan mijn vrouw

'Science has but one language, that  
of quantity, and but one argument,  
that of experiment'.

E.H. Starling

## VOORWOORD

Van de hier geboden gelegenheid maak ik gaarne gebruik al diegenen dank te zeggendie tot mijn medische en wetenschappelijke vorming hebben bijgedragen, alsmede hen die mij bij het tot stand komen van dit werk behulpzaam zijn geweest. Daarbijdenk ik allereerst aan mijn promotor, Prof. Dr. D.W. van Bekkum. Ik beschouw het als een groot voorrecht om te hebben kunnen werken in een dynamische werkgroep zoals deze door hem werd gecreëerd. Zijn vooruitziende blik en actieve belangstelling is bijzonder stimulerend voor zijn medewerkers, vooral ook omdat hij hen daarbij de volledige individuele vrijheid laat ten aanzien van de kunst tot experimenteren: een voorrecht dat door mij op hoge prijs werd gesteld.

De medische studie verrichte ik aan de Utrechtse universiteit, het post-doctorale gedeelte in Rotterdam.

Mijn opleiding als radioloog ontving ik in het Rotterdams Radiotherapeutisch Instituut en het Diaconessenhuis te Rotterdam. De fundamenten daar gelegd bleken buitengewoon hecht. Ik blijf daarvoor Prof. Dr. K. Breur en de radiologen Mevrouw S. den Hoed-Sytsema en J.H. Nauta zeer erkentelijk.

Daarnaast heeft de gehele staf van het Radiobiologisch Instituut TNO aan mijn vorming als experimenteel onderzoeker in belangrijke mate bijgedragen. Alle medewerkers van dit laboratorium die door discussies, raad of daad aan het totstandkomen van dit onderzoek hun steun hebben verleend betuig ik hier mijn oprechte dank. In het bijzonder betreft dit - buiten mijn promotor - Dr. G.W. Barendsen, Dr. M.J. de Vries en Dr. H. Balner voor hun opbouwende adviezen tijdens het onderzoek en tijdens de bewerking van het manuscript.

Vele statistische adviezen mocht ik ontvangen van Drs. J. Kaalen, statisticus van het R.T.I. Ik heb zeer grote waardering voor de belangeloze toewijding, waarmee hij dit heeft gedaan. Ook heb ik grote bewondering voor de snelheid van geest, waarmee hij zich in de gestelde vraagstukken wist in te werken.

Het enthousiasme, waarmede de dames C. de Bree, J. Hordijk en M. Stuart behulpzaam zijn geweest bij het verrichten van dit onderzoek is mij tot grote steun geweest. De adviezen en daadwerkelijke steun, die ik van Dr. H. Galjaard en Mej. J. Buys (MBL-RVO-TNO) ontving, hebben in belangrijke mate bijgedragen tot de ontwikkeling van de histologische technieken, noodzakelijk voor het gebruik van fluorochromen. Voor de zorg, besteed aan de vervaardiging van de instrumenten door de heren A.H. Andreasen en J.E. Nelemans, ben ik zeer erkentelijk.

Dat Prof. Dr. M. Frenkel en Prof. Dr. M.J. de Vries zich in de functie van co-referent in de inhoud van dit proefschrift hebben verdiept wordt door mij op hoge prijs gesteld.

Wat betreft de verzorging van het manuscript is een woord van dank op zijn plaats voor de dames H.A. Zandstra-Overvoorde, E.E.S. Verschoor-Glasber-

gen, Sl. Boranić-Stanesić, A. Ledney-Hanchar en E. Keuning-Schoorel. Ditzelfde geldt voor de vervaardiging van de foto's en diagrammen door de heren J.P. de Kler, A.A. Glaudemans en H.J. van Westbroek. De bibliografische assistentie van de dames H. Broski en M.G.A. Overgaag was mij tot grote steun. Het ontwerp voor de omslag dank ik aan Nono Reinhold en de Heer W. Crouwel, die zich daarvoor in dit voor hen geheel onbekende onderwerp hebben verdiept.

Zeer belangrijk voor het tot stand komen van een proefschrift is de medewerking ondervonden binnen huiselijke kring.

Moge ik besluiten met op te merken dat mijn vrouw steeds die omstandigheden heeft weten te scheppen, waardoor dit werk mogelijk werd.



# Inhoud:

Hoofdstuk I	Pagina
INLEIDING	1
Effecten van bestraling op levende cellen	1
Celoverleving en celoverlevingscurven	2
Parameters	4
Celoverlevingscurven in vivo	6
Zuurstofeffect	9
Stralingsgevoeligheid van weefsels	10
Hoofdstuk II	
TRANSPLANTATIE EN GROEI VAN EXPERIMENTELE TUMOREN	12
Primaire tumoren	12
Transplanteerbare tumoren	13
Immunologische factoren	14
Transplantatie-antigenen	15
Afstoting en 'enhancement'	15
Het aantonen van antigene verschillen tussen tumor en gastheer	16
Grootte van het inoculum	18
Transplantatie technieken.	19
Het transplantaat	19
De transplantatie	21
Groei van tumoren.	23
Meting van het tumorvolume	23
Vorm van de groeicurve	24
De groei van rhabdomyosarcoom BA 1112	26
Het verloop van de groei van tumoren na bestraling	28
De groei van microscopisch kleine tumoren	29

### Hoofdstuk III

CELTITRATIES MET RHABDOMYOSARCOOM BA 1112	33
Keuze van de tumor	33
Histologie	34
Onderzoek naar mogelijke antigene verschillen tussen tumor en gastheer.	35
'Klinische' stralingsgevoeligheid	38
De bereiding van tumorcelsuspensies.	38
Apparatuur	40
Medium	41
Procedure	42
Opbrengst	44
Gebruik van celsuspensies	44
Bepaling van het aantal cellen in het tumorweefsel	44
Bepaling van het zuurstofverbruik van de tumorcellen	45
Tumorceltitratie in vivo	47
Bepaling van de ED50	48

### Hoofdstuk IV

BEPALING VAN DE STRALINGSGEVOELIG- HEID VAN DE CELLEN VAN HET RHABDO- MYOSARCOOM.	50
Inleiding.	50
Methodieken	51
Bestralingsopstelling	51
Berekeningsvoorbeeld	51
Bestraling van de tumorcellen in anoxisch milieu (in situ)	52
Bestraling van de tumorcellen in vitro	53
Bestraling van de tumorcellen in vivo	56
Bespreking van de resultaten	58

## Hoofdstuk V

DE GENEZINGSKANS VAN HET RHABDO- MYOSARCOOM NA BESTRALING.	60
Inleiding.	60
Methodieken	64
Resultaten	68
Bespreking van de resultaten	73

## Hoofdstuk VI

VASCULARISATIE EN OXYGENATIE VAN TUMOREN.	76
Inleiding.	76
Macroscopische onderzoeken.	76
Arteriografie	76
Kleurstofdifusie	77
Physiologische onderzoeken	78
Bepaling van het zuurstofgehalte van het veneuze bloed	78
Polarografie	78
Microscopische onderzoeken	79
Directe observatie	79
Histologie	79
Vasculaire architectuur	80
Zuurstofdifusie	82
Eigen onderzoek betreffende de diffusie van kleurstoffen.	83
Fluorescerende kleurstoffen	84
Techniek	84
Resultaten	85

## Hoofdstuk VII

INTERPRETATIE VAN EXPERIMENTEEL VERKREGEN GEGEVENS EN HET BELANG DAARVAN VOOR DE KLINISCHE RADIO- THERAPIE.	88
Het begrip 'stralingsgevoeligheid'.	88
Celoverleving	88
Invloed van anoxie	89
Gezonde weefsels	90
Invloed van fractionering	90
'Elkind type' herstel	91
Repopulatie	92
Verbeterde oxygenatie	93
Optimale fractionering; verdere ontwikkeling van het onderzoek.	93
SAMENVATTING	95
SUMMARY	99
LITERATUUR	103

## HOOFDSTUK I

# INLEIDING

### Effecten van bestraling op levende cellen

Het belangrijkste doel van een radiologische behandeling van een maligne aandoening is het bereiken van een genezing door het doden van alle tumorcellen. Het streven van de klinische radiotherapie is om het maligne proces te genezen met een minimum aan ongemakken voor de patiënt; de radioloog beziet dus zijn patiënt als geheel en let niet alleen op het tumorweefsel.

Indien men echter de factoren wil bestuderen welke de therapeutische resultaten beïnvloeden zal men zijn aandacht in de eerste plaats op het maligne proces moeten richten. Het mag als de taak van de radiobioloog worden gezien om gegevens te verzamelen over de reacties van een tumor op bestraling. Bij voorkeur maakt hij daarbij gebruik van experimentele modellen, waarin alle samenstellende factoren afzonderlijk kunnen worden bestudeerd.

Sinds de eeuwwisseling heeft het niet aan pogingen ontbroken om de reactie van tumoren op bestraling quantitatief te waarderen. Er is bijvoorbeeld veel werk verricht om histologische criteria voor de stralingsgevoeligheid van de tumorcellen te vinden. Een kenmerk van vele maligne gezwellen is de verhoogde celdelingsactiviteit van het tumorweefsel vergeleken met dat van het normale weefsel waar de tumor van uitgaat en reeds voor de twintiger jaren was bekend dat het celdelingsproces uiterst gevoelig is voor bestraling. Tot voor kort probeerde men dan ook de reactie van tumoren op bestraling te verklaren via de mechanismen die het mitose-uitstel na bestraling veroorzaken (100). Toch kan het tijdelijk achterwege blijven van celdelingen na bestraling niet bepalend zijn voor de totale stralingsschade aan het tumorweefsel; het doel van de radiologische behandeling is pas bereikt wanneer alle maligne cellen voor altijd hun celdelingsactiviteit gestaakt hebben, onverschillig of dit tot stand is gekomen door het doden of door het steriliseren van deze cellen. Immers, indien de tumorcellen in aansluiting op het laatste, welbekende effect van bestraling niet direct zouden verdwijnen maar zouden overgaan in een meer gedifferentieerde vorm, zal het gevaar voor de patiënt toch zijn geweken. Voor de beoordeling van de schade die de cellen in het tumorweefsel door de zojuist beschreven mechanismen ondervinden is een quantitatieve maatstaf onontbeerlijk. Echter, zelfs indien men met behulp van histologische technieken onderscheid zou kunnen maken tussen intacte en door bestraling gesteriliseerde tumorcellen, zou het nog zeer de vraag zijn of het aantal intacte cellen quantitatief zou zijn te bepalen geziende overmaat gesteriliseerde cellen die aanwezig is. Men zou in dit verband een parallel kunnen trekken met sommige soorten bacteriële infecties, bijvoorbeeld met een tuberculeus veranderde

lymphklier (81). Het micro-organisme is hierin moeilijk aantoonbaar en volgens ruwe schattingen moeten er ongeveer 100.000 bacillen per gram weefsel aanwezig zijn vóór men met histologische routine technieken de diagnose kan stellen. Het kweken van de bacillen uit een monster van dit weefsel in een daartoe geschikte voedingsbodem is dan ook veel betrouwbaarder. Bij gebruik van een geschikt proefdier (cavia) zijn bovendien geringe aantallen bacillen aantoonbaar door overenting van het suspecte materiaal.

Tumorcellen hebben net als micro-organismen de eigenschap om in een voor hen geschikt milieu zich voortdurend te kunnen delen. Van deze eigenschap kan gebruik worden gemaakt om deze cellen aan te tonen; na enting in een gastheer kunnen tumoren ontstaan, in weefselkweek kolonies van tumorcellen. Weefselkweektechnieken lenen zich bijzonder goed voor de bestudering van de verschillende aspecten van de proliferatie van tumorcellen en het is de verdienste van Puck en Marcus geweest om deze technieken dusdanig te vervolmaken dat individueel geënte cellen tot kolonies (of clonen) kunnen uitgroeien. (87).

Het was hiermede voor het eerst mogelijk geworden om onderscheid te maken tussen overlevende en door bestraling gedode of gesteriliseerde cellen; slechts de eerste kunnen uitgroeien tot 'volwassen' clonen.

## Celoverleving en celoverlevingscurven

Door telling van het aantal clonen dat uit een zeker aantal geënte cellen ontstaat kan men nauwkeurig de verhouding bepalen tussen het aantal gedode en het aantal overlevende cellen die in het uitgangsmateriaal aanwezig waren. Met deze 'clone counting technique' meet men aldus het percentage van de cellen dat ontsnapt is aan de sterilisatie door bestraling. Dit heeft dus slechts betrekking op het verlies van één bepaalde eigenschap, nl. het vermogen van de (tumor) cel om zich onbepert te kunnen delen\*.

Het criterium voor overleving heeft dus niets te maken met het al dan niet morfologisch intact zijn van de cellen na bestraling. De door de bestraling gesteriliseerde cellen behoeven niet onmiddellijk te desintegreren; het metabolisme van deze cellen blijft vaak nog geruime tijd intact. De stralingsschade uit zich meestal pas later in het permanent uitblijven van de celdeling of in het te gronde gaan van de cel tijdens één van de eerstvolgende celdelingen. Dit verschijnsel van het nog enige tijd aanwezig zijn van de gesteriliseerde,

---

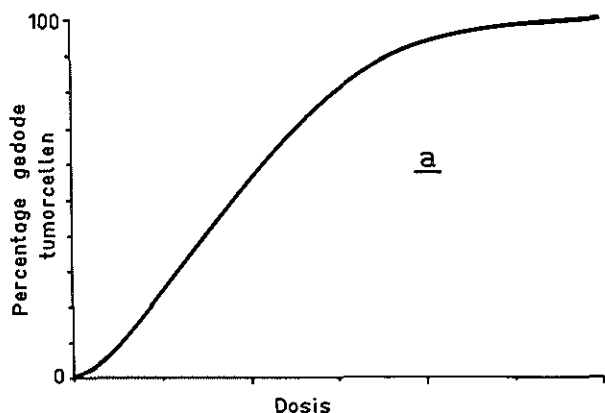
\*Wanneer een cel in staat blijkt om binnen een bepaalde tijd een kloon van 50 cellen te vormen, wordt algemeen aangenomen dat het vermogen tot 'onbeperte proliferatie' van deze cel behouden is gebleven.

Over de juistheid van deze definitie is de laatste tijd enige twijfel gerezen naar aanleiding van waarnemingen dat een zeer gering gedeelte van de bestraalde celpopulatie een vertraagde groei zou hebben en dus misschien bij de overlevende fractie gerekend zou moeten worden (95), ofschoon de daaruit ontstane clonen niet binnen de gestelde tijd de bovengenoemde omvang bereiken.

maar overigens intacte cellen tussen de overlevende cellen, blijkt moeilijkheden op te leveren bij de omschrijving van het proces van de beschadiging van de cellen door de bestraling. Vele auteurs gebruiken eigen bewoordingen en Robinson heeft er dan ook in de literatuur niet minder dan zestien verschillende uitdrukkingen\* voor kunnen vinden (92).

In dit proefschrift zal naast de uitdrukking 'gesteriliseerde cellen' het equivalent 'gedode cellen' gebruikt worden. De cellen die aan het sterilisatieproces zijn ontsnapt worden 'overlevende cellen' genoemd.

Volgens de gebruikelijke methode zou men een dosis-effect curve kunnen maken die de relatie weergeeft tussen het percentage gedode cellen en de dosis (straling) die hiervoor nodig was; een dergelijke curve zal verlopen als in figuur 1a, d.w.z. de curve nadert asymptotisch tot 100% dode cellen. Onze belangstelling gaat echter niet uit naar het aantal gedode cellen, maar juist naar



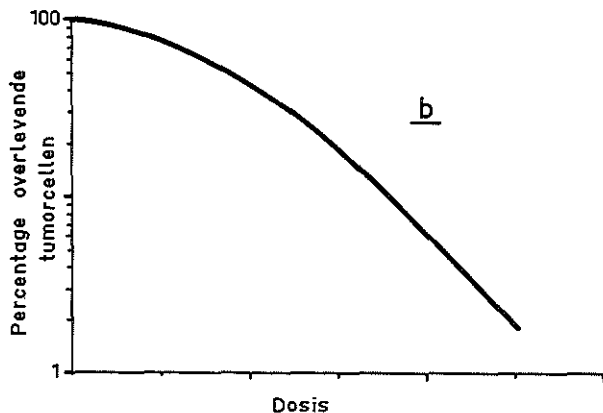
Figuur 1a MODEL VAN EEN DOSIS-EFFECT CURVE BETREFFENDE CELDOOD NA BESTRALING.

dät gedeelte van de celpopulatie dat de bestraling heeft overleefd. De zojuist genoemde dosis-effect relatie kan ook worden weergegeven - zoals Puck en Marcus dit bij de bewerking van hun resultaten met gekweekte cellen introduceerden - op een schaal waarbij de fractie overlevende cellen wordt uitgezet

\*De uitdrukkingen welke Robinson noemt zijn:

'cellular death, cellular lethality, reproductive death, reproductive incapacity, inhibition of clone formation, damage to reproductive capacity, inhibition of unlimited proliferation, lethal events, killing, reproductive cell killing, loss of reproductive integrity, cell killing, effect on ability to proliferate, loss of proliferative capacity, loss of proliferative integrity, lethality'.

op de ordinaat (87). Dit wordt in figuur 1b weergegeven. De ordinaat heeft op deze figuur een logaritmische indeling en het is mogelijk op de curve af te lezen welk gedeelte van de populatie bij toename van de dosis nog overleeft.



Figuur 1b DEZELFDE RELATIE ALS VAN FIGUUR 1a. Het percentage overlevende cellen is nu uitgezet op de ordinaat op logaritmische schaal.

Het is door deze wijze van presentatie dus mogelijk geworden de stralingsgevoeligheid van een weefsel te omschrijven in termen van de 'celoverlevingscurve' van de cellen waaruit dit weefsel is opgebouwd. Er zijn reeds veel publicaties verschenen over celoverlevingscurven van gekweekte cellen en een aantal van de met dit criterium onderzochte cellulaire systemen in vivo blijkt overeenkomstige dosis-effect relaties te vertonen. Hierop zal in een volgend deel van dit hoofdstuk nader worden ingegaan.

### Parameters

Aangezien het begrip 'celoverlevingscurve' veelvuldig in dit proefschrift zal worden gebruikt, dient eerst een bespreking te volgen over de vorm van deze curve, evenals van de parameters die in gebruik zijn om de curve te omschrijven.

Een model van een dergelijke curve is daartoe weergegeven in figuur 2. De curve heeft op semi-logaritmische schaal een initiële 'schouder', gevolgd door een recht gedeelte, waarin de dosis-effect relatie exponentieel verloopt\*. De vorm van een dergelijke curve kan worden omschreven door 1<sup>e</sup> een getal dat de helling van het exponentiële gedeelte van de curve omschrijft en 2<sup>e</sup> een qualificatie van de vorm van de schouder van de curve.

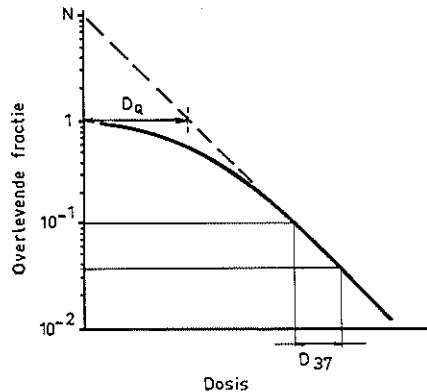
\*Zelfs onder biophysici bestaat nog geen overeenstemming over de vraag of de celoverlevingscurve al dan niet een zuiver exponentieel verloop heeft in het gebied van de zeer geringe overlevingspercentages. Dit houdt onder meer verband met de vrij grote experimentele foutengrenzen in dit gebied, waardoor de juiste vorm van de curve niet met zekerheid bepaald kan worden. Daar het mechanisme van de initiële stralingslaesie nog niet volledig bekend is, kan de vorm van de curve ook niet op theoretische gronden voorspeld worden (40).

De hierboven beschreven vorm van de curve wordt dan ook - zeker voor de presentatie van de in vivo verkregen resultaten - nog algemeen gebruikt.



Ad 1. Indien de treffertheorie van toepassing wordt geacht kan aan de parameter  $D_{37}$ , die een maat is voor de helling van de curve in het exponentiële gedeelte, een bijzondere interpretatie worden gegeven. Deze  $D_{37}$  (ook inactiveringsdosis genoemd) is dan die hoeveelheid straling welke voldoende is om - ge-

Figuur 2 DE VERSCHILLENDE PARAMETEREN VAN DE CELOVERLEVINGSCURVEN.



middeld over de gehele populatie - elke cel juist één dodelijk quantum te bezorgen. Door statistische bewerking kan nl. worden aangetoond dat in die situatie niet 100% van de cellen dodelijk getroffen zal worden, maar slechts 63%. Dit houdt in, dat 37% van de cellen de bestraling heeft overleefd en elke aansluitende inactiveringsdosis de resterende populatie tot 37% hiervan terugbrengt. Sommige auteurs prefereren de uitdrukking  $D_0$  in plaats van  $D_{37}$ .

De uitdrukking  $D_{37}$  is alleen bruikbaar in het exponentiële gedeelte van de curve; er zou dus verwarring kunnen ontstaan indien men deze zou willen toepassen in het schoudergebied.

Ad 2. Voor de qualificatie van de vorm van de schouder wordt vaak gebruik gemaakt van extrapolatie van het 'rechte' gedeelte van de curve naar dosis 0; het snijpunt van de geëxtrapolerde curve met de ordinaat wordt het 'extrapolatiegetal'  $N$  genoemd. Het is ook mogelijk het snijpunt met het 100% overlevingsniveau te gebruiken, men vindt dan een dosis die  $DQ$  is genoemd (5). Deze laatste uitdrukking wordt nog slechts zelden gebezigd bij de omschrijving van celoverlevingscurven. Hoewel de zojuist genoemde parameters door de meerderheid der auteurs klaarblijkelijk zijn geaccepteerd voor de omschrijving van celoverlevingscurven *in vivo*, is de vorm daarvan toch nog niet volledig bepaald door  $D_{37}$  en  $N$ . De juiste vorm van de schouder en de plaats van overgang tot het rechte gedeelte van de curve zou nog nader bepaald moeten worden. Dit is echter nog niet mogelijk gebleken doordat de experimentele spreiding - speciaal in de *in vivo* systemen - een nauwkeurige bepaling van de vorm van de schouder verhindert. Daardoor kan ook nog geen oordeel verkregen worden over kleine verschillen in de vorm van de schouder, welke toch van grote invloed kunnen zijn op de reactie van cellen op gefractioneerde bestraling (8).

## Celoverlevingscurven in vivo

Na de publicatie van de eerste celoverlevingscurven door Puck en Marcus zijn vele onderzoekingen op dit gebied verricht, zowel in vitro als in vivo. De methoden van onderzoek hiervoor zijn vanzelfsprekend verschillend en bovendien afhankelijk van de celsoort.

Het in vitro-systeem werd reeds uitvoerig besproken. Het was Hewitt die als eerste een celoverlevingscurve bepaalde voor een weefsel in vivo (59). Het betrof een muize-leucaemie die quantitatief werd getransplanteerd met als criterium voor de viabiliteit van de tumorcellsuspensie het aantal cellen dat nodig was om in de helft van de gastheren een tumor te doen ontstaan. De door hem gevonden celoverlevingscurve toonde veel overeenkomst met die welke

TABEL I

### D<sub>37</sub> WAARDEN VAN CELLEN VAN VERSCHILLENDE

	Weefsel	Methode bepaling celoverleving	Bestralingscondities
GEZONDE WEEFSELS	Beenmerg muis	celtitratie	in vitro
	" "	"	in vitro
	" "	"	in vitro
	" "	aantal kolonies in de milt	in vitro
	Lymphklier muis	celtitratie	in vitro
	Huid muis	aantal regenererende epitheel-foci	in vivo
	Kraakbeen muis	aantal regenererende kraakbeen-foci	in vivo
LOS CELLEGE TUMOREN	Leucaemie muis	tumorceltitratie	in vivo (lever)
	Lymphosarcoom muis	"	in vivo (lever en milt) in vitro
	" "	aantal kolonies in de milt	in vivo (lever en milt) in vitro
	Ascites lymfoom muis	tumorceltitratie	in vivo (ascites + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *)
	Ehrlich ascites tumor muis	"	in vitro

\*Ter vermindering van anoxie werd vóór de bestraling waterstofperoxyde intraperitoneaal geïnjecteerd.

door Puck en Marcus in vitro o.m. voor HeLa cellen was bepaald. Voor het door Hewitt gebruikte systeem, de z.g. tumorceltitratie, zijn zeer veel proefdieren vereist. Dit aantal kan enigszins worden verminderd door - bij daarvoor geschikte tumoren - het aantal kolonies te tellen dat na intraveneuze injectie in de milt van bestraalde gastheren ontstaat. Bush en Bruce pasten deze methode toe ten einde een celoverlevingscurve te bepalen voor een muize-leucaemie (17). Om een celoverlevingscurve van lymfoïde cellen te kunnen bepalen maakten Smith en Vos gebruik van de 'graft versus host' reactie van getransplanteerde lymfoïde cellen (98). Bij alle tot zover beschreven in vivo methoden wordt gebruik gemaakt van transplantatie-technieken.

#### WEEFSELS NA EENMALIGE BESTRALING

Bestr. bron.	N	D <sub>37</sub>	Auteur en	jaar	Ref.
Co <sup>60</sup> γ } " γ } 200 kVp Rø Co <sup>60</sup> γ	1 2,5 2	105 rads 84 R 115 rads	McCullough en Till Smith en Vos Till en McCullough	1960 1962 1961	(80) (97) (111)
200 kVp Rø 150 kVp Rø	2,7	74 R 115 rads	Smith en Vos Withers	1963 1966	(98) (119)
230 kVp Rø	6	190 rads	Kember	1965	(71)
Co <sup>60</sup> γ " } " } " } " }	2 1,9 0,7	165 R 133 rads 114 rads	Hewitt en Wilson Bush en Bruce Bush en Bruce	1959 1965 1965	(60) (18) (18)
3 MeV Rø 200 kV Rø	1,6 15,4	160 rads 114 rads	Andrews en Berry Hornsey en Silini	1961 1961	(6) (63)

Voor de bestudering van de overleving van cellen in gezonde weefsels in situ zijn kortgeleden enkele zeer originele methoden beschreven: Withers telde het aantal regenererende epitheelilandjes in de bestraalde huid van muizen (119); Kember (71) gebruikte een overeenkomstige techniek bij de bestudering van de stralingsgevoeligheid van het kraakbeen van de muis.

In Tabel I zijn een aantal waarden uit de literatuur samengevat voor zover deze betrekking hebben op systemen waarbij de celoverleving na bestraling in vivo werd gemeten. De bestraling vond vaak plaats in vitro tervermijding van anoxie van de cellen. Verderop in dit hoofdstuk zal daarop nader worden ingegaan.

De in de tabel vermelde kenmerken blijken grotendeels overeen te komen met die, welke voor vele cellijnen in weefselkweek gevonden werden en waarvan de gemiddelde waarde omstreeks 130 rads bedraagt (117). Nadere beschouwing van tabel I doet vermoeden dat er evenmin opvallende verschillen bestaan tussen de  $D_{37}$  waarde van de cellen van de onderzochte gezonde weefsels en van de genoemde 'loscellige' of gedissemineerd groeiende experimentele tumoren zoals ascites-tumoren en leucaemieën. Stralingsresistente menselijke tumoren behoren in het algemeen echter niet tot die groep; zij hebben daarentegen een zeer bepaalde structuur, met een eigen stroma en vaatnet. Dit soort tumoren wordt ter onderscheiding van de eerder genoemde groep in de tumorradiobiologie 'solide' tumoren genoemd. Men mag niet zonder meer aannemen dat de stralingsgevoeligheid van cellen van deze tumoren vergelijkbaar is met die van de in tabel I genoemde tumoren.

Of men uit de tot zover beschikbare gegevens moet concluderen dat de celoverlevingscurven van cellen van verschillende oorsprong elkaar al dan niet veel ontlopen, blijkt een controversieel punt te zijn (117). Hewitt in het bijzonder wordt meer getroffen door de opvallende overeenkomst dan door de verschillen tussen de curven; sommige verschillen zouden zijns inziens kunnen berusten op technische factoren. Het zij hierbij opgemerkt dat de  $D_{37}$  waarde niet alléén maatgevend is voor de bepaling van de stralingsgevoeligheid van de cellen van de verschillende weefsels; vooral bij lagere dosering is de exacte vorm van de schouder van groot belang en zoals verder in dit hoofdstuk zal worden besproken heeft de locale zuurstofconcentratie in het weefsel grote invloed op de stralingsgevoeligheid van de cellen in bepaalde gebieden in de tumor.

Het is ieder die de invloed van bestraling op levende weefsels observeert duidelijk dat er tussen verschillende soorten weefsels toch wel degelijk verschillen in reactie op bestraling bestaan. Dit geldt zowel voor klinische waarnemingen als voor experimentele resultaten. Wanneer men echter de reactie slechts betreft op de celoverleving - of sterilisatie - blijken de verschillen aanzienlijk minder opvallend, maar mogelijk wél aanwezig. Zo vond Broerse aanwijzingen dat het beenmerg van de muis gevoeliger is voor bestraling dan het darmepitheel (16).

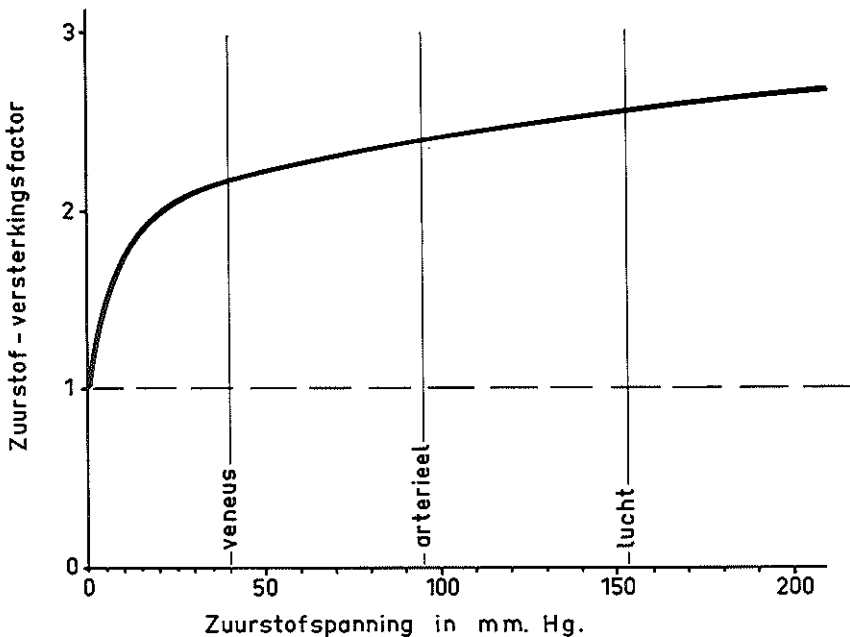
Het is echter opmerkelijk dat er tot op heden nog geen aanwijzingen zijn gevonden dat er systematische verschillen zouden bestaan in de  $D_{37}$  waarde tussen cellen afkomstig van gezwollen en van normale weefsels, tussen cellen

in vitro en in vivo of tussen cellijnen, afkomstig van verschillende zoogdieren, waaronder de mens. Andere variabelen spelen dus waarschijnlijk een belangrijker rol, zoals de vorm van de schouder en de zuurstofconcentratie.

Eerder in dit hoofdstuk werd enkele malen de betekenis van de zuurstofconcentratie in het weefsel voor de stralingsgevoeligheid van de daarin gelegen cellen genoemd. Dit betekent dat een door fysiologische omstandigheden bepaalde variabele de stralingsgevoeligheid zal kunnen beïnvloeden. De volgende paragrafen zijn aan een bespreking hiervan gewijd.

## Zuurstofeffect

Reeds sinds enkele decennia is bekend dat vele biologische systemen in aanwezigheid van zuurstof gevoeliger zijn voor ioniserende straling dan in afwezigheid van zuurstof. Dit verschijnsel staat bekend als het 'zuurstofeffect'. Het



Figuur 3 RELATIE TUSSEN DE ZUURSTOFSPANNING IN HET MEDIUM EN DE STRALINGS-GEVOELIGHEID VAN MENSELIJKE NIERCELLEN IN WEEFSELKWEK. (naar Barendsen, 1960).

blijkt dat wanneer in het milieu geen zuurstof aanwezig is de dosis ioniserende straling met een factor twee à drie verhoogd dient te worden om hetzelfde biologische effect te verkrijgen als wanneer de bestraling in lucht wordt uitgevoerd. Deze 'Oxygen Enhancement Ratio' (O.E.R.) of 'zuurstofversterkingsfactor' wordt dus niet uitgedrukt in de verhouding van de grootte van de biologische schade door eenzelfde dosis straling in verschillende concentraties

zuurstof, maar in de verhouding van de doses, waarmede eenzelfde biologisch effect verkregen wordt bij verschillende zuurstofconcentraties.

Een uitgebreide studie van de kwantitatieve aspecten van dit effect werd het eerst verricht door Gray en medewerkers (45), met als criterium voor de biologische schade het aantal chromosoom-afwijkingen van cellen van de Ehrlich ascites tumor na bestraling in verschillende zuurstof-stikstof mengsels. Barndsen vond een overeenkomstige relatie tussen stralingsgevoeligheid en zuurstofconcentratie wanneer de overleving van cellen van een gekweekte cellijn, afkomstig van een menselijke nier, als criterium werd gebruikt (9). Figuur 3 is hiervan afgeleid en uit deze figuur blijkt dat de stralingsgevoeligheid niet lineair afhankelijk is van de zuurstofconcentratie. Belangrijk is dat in het 'fysiologische' gebied tussen de arteriële en veneuze zuurstofspanning de zuurstofversterkingsfactor al dicht is genaderd tot de maximale waarde en dat een reductie hiervan tot op de helft pas plaats heeft bij een zuurstofspanning van 4 à 5 mm Hg.

Gezien de complexe relatie tussen de zuurstofspanning en de stralingsgevoeligheid van de cellen is het gebruikelijk om bij de bepaling van celoverlevingscurven slechts onder twee condities te bestralen, te weten onder volledige anoxie en in lucht. Wanneer cellen *in vitro* worden bestraald onder de bovenbeschreven condities, zullen de celoverlevingscurven een aspect krijgen zoals in figuur 4 schematisch is afgebeeld. Het is duidelijk dat het al dan niet aanwezig zijn van zuurstof in het milieu tijdens de bestraling de kans op overleving van de cellen in belangrijke mate beïnvloedt. De verhouding tussen de overlevende fracties van anoxische en goed geoxygeneerde cellen kan bijvoorbeeld na een enkelvoudige dosis van 2700 rads een factor  $10^6$  bedragen!

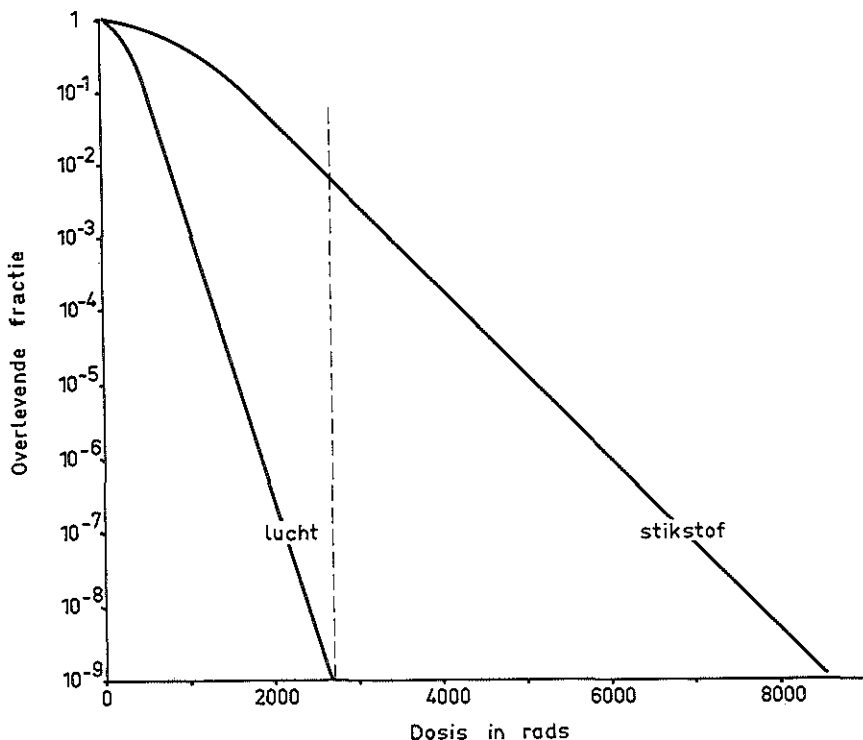
## Stralingsgevoeligheid van weefsels

Uit het voorafgaande is gebleken dat de stralingsgevoeligheid van de cellen die tezamen een weefsel vormen niet alleen afhankelijk is van de vorm van de celoverlevingscurve, maar ook van een aantal fysiologische factoren die de zuurstofvoorziening van de betreffende cellen beheersen.

Voor het juiste begrip van de processen die zich afspelen in bestraald tumorweefsel, in het bijzonder van stralingsresistente solide tumoren, is het in de eerste plaats van belang te weten of de vorm van de overlevingscurve van de tumorcellen afwijkend zal zijn ten opzichte van die van cellen van andere weefsels.

Daarom werd voor het onderzoek dat het onderwerp vormt van dit proefschrift - na overweging van een aantal factoren die in hoofdstuk II ter sprake komen - een systeem ontwikkeld dat het mogelijk maakt de viabiliteit van tumorcellen te meten nadat deze uit een solide tumor zijn geïsoleerd. De keuze van de tumor en de experimentele procedure vormt het onderwerp van hoofdstuk III. Met behulp van deze procedure is het mogelijk geworden celoverlevingscurven te bepalen van de tumorcellen onder verschillende bestralingscondities, zoals in hoofdstuk IV zal blijken.

Toen deze celoverlevingscurven bepaald waren, rees de vraag of de genezingskans van de tumor nu ook inderdaad uit de verkregen resultaten voorspeld zou kunnen worden.



Figuur 4 SCHEMATISCHE VOORSTELLING VAN DE INVLOED VAN HET ZUURSTOFEFFECT OP DE STRALINGSGEVOELIGHEID VAN CELLEN.

Om deze vraag te kunnen beantwoorden moest een 'curatief' bestralingssysteem ontworpen worden. In hoofdstuk V wordt aangetoond dat de resultaten, verkregen met beide systemen, inderdaad met elkaar in overeenstemming zijn.

Omdat de stralingsgevoeligheid van cellen sterk afhankelijk is gebleken van de aanwezige zuurstofconcentratie ter plaatse en deze op zijn beurt van de vascularisatie van het tumorweefsel, werd het onderzoek afgesloten met de bestudering van enkele aspecten van de bloedvatvoorziening van de tumor (Hoofdstuk VI). Hiertoe werd een nieuwe microscopische techniek ontwikkeld waarbij gebruik gemaakt wordt van fluorescerende kleurstoffen.

Tenslotte zal in hoofdstuk VII worden besproken in hoeverre de in dit onderzoek verkregen resultaten inderdaad het inzicht kunnen verruimen over de processen die zich afspelen in menselijke tumoren onder invloed van een radiotherapeutische behandeling.

\* \* \* \* \*

# TRANSPLANTATIE EN GROEI VAN EXPERIMENTELE TUMOREN

Zoals in het vorige hoofdstuk werd ingeleid, heeft het in dit proefschrift beschreven onderzoek onder meer betrekking op factoren, die de genezingskans van een solide, experimentele tumor na bestraling kunnen beïnvloeden.

Om een dergelijk onderzoek te kunnen verrichten is het noodzakelijk over een geschikte experimentele tumor te beschikken en in principe zou men daartoe de keuze hebben uit primaire\* en (routinematig) getransplanteerde\* tumoren. Na overweging van de verschillende mogelijkheden, die in de volgende alinea's behandeld zullen worden, werd besloten tot het gebruik van een transplanteerbare tumor. Een gedeelte van dit hoofdstuk zal gewijd zijn aan een bespreking van de vele complicerende factoren die bij het gebruik hiervan kunnen optreden.

### Primaire tumoren

Het meeste werk op het gebied van de experimentele radiobiologie van tumoren wordt verricht met het doel de verkregen ervaringen toe te passen in de kliniek. Daarom zou de experimentele radiotherapie bij voorkeur moeten worden beproefd op spontane tumoren, die optreden bij primaten (apen), of eventueel bij grote huisdieren zoals honden, konijnen en dergelijke. Het algemene klinische beeld, zowel van de gastheer als van de tumor, (diagnostiek, stralingsreacties, groeisnelheid, localisatie en grootte van de tumor) zou dan dat van de menselijke tumoren zo dicht mogelijk benaderen. Inderdaad wordt reeds enig werk verricht op het gebied van de experimentele radiotherapie bij grote huisdieren (94).

Het behoeft echter geen betoog, dat voor de uitvoering van een uitgebreid experimenteel programma grotere groependieren nodig zijn, waarbij tevens de eis gesteld dient te worden, dat de te behandelen tumoren onderling geen grote verschillen tonen. In de praktijk is men dan aangewezen op het gebruik van knaagdieren, in het bijzonder muizen en ratten.

Men zou van de beide laatste diersoorten stammen kunnen gebruiken met een hoge 'spontane' tumorfrequentie, zoals de C3H muis. Bij een hoog percen-

---

\*In de literatuur wordt veelal niet duidelijk genoeg naar voren gebracht met welk tumor-type een bepaald onderzoek verricht werd. Of een tumor spontaan dan wel geïnduceerd is heeft betrekking op de ontstaanswijze van het gezwel. Onafhankelijk daarvan kan de aanwezigheid van een tumor in een gastheer het gevolg zijn van een primaire groei of van transplantatie van levende tumorcellen.



tage van de vrouwelijke individuen van deze stam ontwikkelt zich een mammatumor. Toch heeft deze veel bestudeerde tumor ook een aantal bezwaren voor radiobiologische onderzoeken: de beïnvloeding van de tumorgroei door hormonale factoren compliceert de interpretatie van de resultaten en multipole tumoren kunnen over het gehele gebied van de 'melklijn' ontstaan, hetgeen uiterst verwarrend kan zijn bij de 'follow up' van curatief bestraalde tumoren (32).

Verder speelt ook een virus (Bittner 'milk agent') een rol bij het ontstaan van deze tumoren (83). In hoeverre dit laatste zou kunnen interfereren met de resultaten van bestralingsexperimenten, is onbekend.

Een andere mogelijkheid om grote aantallen min of meer gelijksoortige tumoren te verkrijgen is door inductie met behulp van straling, chemische carcinogenen of virussen. Het tijdstip van ontstaan van deze tumoren heeft men echter niet goed in de hand. Daarbij is aangetoond dat sommige geïnduceerde tumoren afwijkende antigenen\* eigenschappen bezitten (84) en dit maakt ook deze methode weinig aantrekkelijk.

Samenvattend kan worden vastgesteld dat het gebruik van primaire tumoren voor quantitative radiobiologische onderzoeken in het algemeen bezwaarlijk zal zijn.

## Transplanteerbare tumoren

Het onderzoek met transplanteerbare tumoren is daarom op het ogenblik de beste benadering voor quantitative studies en dit systeem wordt dan ook door de meeste onderzoekers gebruikt. Transplanteerbare tumoren kunnen zowel afkomstig zijn van spontane als van geïnduceerde gezwellen. De transplanteerbaarheid van de tumor kan soms in de eerste transplantatiegeneraties vrij slecht zijn, maar neemt bij de meeste tumoren bij herhaaldelijk transplanteren toe; op de duur blijken de meeste transplanteerbare tumoren zich dusdanig te hebben aangepast dat na transplantatie van de gebruikelijke grote inocula in alle gastheren een nieuwe tumor ontstaat. Het mechanisme dat aan deze veranderingen ten grondslag ligt is nog niet geheel duidelijk. Ook na langdurig transplanteren zijn veranderingen in het groeipatroon en in andere eigenschappen beschreven. De complicaties die daardoor in de loop van een langdurig onderzoek ontstaan, kunnen worden vermeden door de tumorcellen met behulp van speciale technieken in te vriezen en bij een temperatuur van ongeveer -200 °C te bewaren (88). Men kan dan zelfs na jaren weer met tumorweefsel van dezelfde 'ouderdom' experimenteren.

Afhankelijk van de tumor-gastheer relatie spreekt men over een 'autoloog', 'isoloog', 'homoloog', of 'heteroloog' transplantaat\*\* . De definities hiervan zijn

\*Op de complicaties die ontstaan doordat een tumor antigenen bezit welke verschillen met die van de gastheer zal later worden ingegaan

\*\*De nieuwe nomenclatuur voor deze begrippen wordt nog slechts zelden in de tumor-radiobiologie gebezigd.

Syngeen = isoloog, allageen = homoloog, xenogeen of heterospecifiek = heteroloog.

als volgt: Onder autologe transplantatie verstaat men het overbrengen van weefsel in de eigen gastheer, onder isologe transplantatie het overbrengen van weefsel op een dier van dezelfde, ingeteelde stam. (Een proefdierstam kan uit het oogpunt van de transplantatie-biologie als genetisch 'homogeen' worden beschouwd indien onderling uitgewisselde huidtransplantaties permanent worden geaccepteerd; dit is bij knaagdieren het geval na omstreeks 20 generaties inteelt.) Homologe transplantatie geschiedt tussen genetisch niet-identieke individuen van dezelfde diersoort en heterologe transplantatie tussen individuen van verschillende diersoorten.

Om de groei van een homoloog of heteroloog tumortransplantaat langer dan een zeer beperkte periode mogelijk te maken zal aan bepaalde immunologische voorwaarden moeten worden voldaan, zoals in de volgende bladzijden zal worden duidelijk gemaakt.

### Immunologische factoren

Voor de experimentele tumortherapie wordt isologe transplantatie algemeen gebruikt. Een dergelijk systeem maakt het soms mogelijk, met slechts enkele cellen een tumor (leucaemieën, ascites tumoren) te transplanteren. (51) Het reproduceerbaar transplanteren van tumoren met enkele cellen is voor radiobiologische studies van groot voordeel, zoals uit de volgende hoofdstukken zal blijken.

Een voorwaarde voor een dergelijke optimale transplanteerbaarheid is uiteraard dat er géén antigene verschillen bestaan tussen tumor en gastheer, omdat anders een dergelijk klein inoculum zeer snel wordt afgestoten\*. Aan deze voorwaarde is niet zonder meer voldaan door van een tumor uit te gaan die in een individu van een ingeteelde stam is ontstaan. Vrij veel geïnduceerde tumoren en zelfs spontane tumoren blijken antigene verschillen te vertonen met de gastheer.

Het controversionele probleem of er tumorspecifieke antigenen in menselijke tumoren aanwezig zijn en hoe men deze zou kunnen aantonen valt buiten het terrein van dit proefschrift.

In de literatuur is er enkele malen op gewezen dat in een getransplanteerde tumor bacteriën occult aanwezig zijn (70). Hoe vaak dit voorkomt en of een dergelijke infectie van invloed is op een mogelijke immunologische afweer tegen het gehele transplantaat is onbekend. Regelmatige bacteriologische controle van een tumortransplantatiesysteem lijkt echter in ieder geval gewenst.

In de volgende bladzijden is een beknopte uiteenzetting gegeven van de problemen betreffende immunologische incompatibiliteit van experimentele tumoren t.o.v. de gastheer.

---

\*Onder 'afstoting' verstaat men het complex van immunologische gebeurtenissen welke leiden tot het niet-aanslaan en dus loslaten van het transplantaat.

## Transplantatie-antigenen

Doordat transplanteerbare tumoren veelal uit snel prolifererend weefsel bestaan, kan het lot van zo'n tumortransplantaat essentieel verschillend zijn van dat van andere getransplanteerde weefsels zoals de huid of de nier. Ook indien een immunologische reactie van de zijde van de gastheer optreedt kan het voorkomen dat de tumor aanslaat en doorgroeit, nl. wanneer de groei van de tumor sneller is dan de immunologische vernietiging van de antigene cellen van de gastheer. De oorspronkelijke grootte van het inoculum kan hierbij soms beslissend zijn. Succesvolle transplantatie van een tumor in een genetisch niet identiek milieu is dus mogelijk; het vroegere werk op het gebied van transplantatie van experimentele tumoren, waarbij met niet-ingeteelde proefdierstammen werd gewerkt, toont dit overduidelijk aan (93).

Zo is de zeer veel gebruikte Ehrlich ascites tumor berucht vanwege zijn antigene eigenschappen. De waarde van deze tumor voor kwantitatief radiobiologisch werk wordt dan ook tegenwoordig sterk betwijfeld (93).

## Afstoting en 'enhancement'

Het effect van voldoende sterke immuunreacties op een antigene tumor zal dus een afstoting van het transplantaat kunnen zijn. Dit kan zich uiten in een verminderd 'percentage dieren met tumor' \*, of in een latere regressie van een aanvankelijk goed 'aangeslagen' tumormassa. Afhankelijk van het type tumorweefsel zal de immunologische reactie die tot afstoting van een transplantaat leidt voornamelijk door humorale of cellulaire ('cell-bound') antistoffen geschieden. Merkwaaarderwijze blijkt echter het ontstaan van humorale antistoffen niet altijd tot een afstoting van het getransplanteerde weefsel te leiden en onder bepaalde omstandigheden kan juist een groeibevorderend effect plaatsvinden: de zogenaamde 'immunological enhancement' (67). Deze 'immunologische groeibevordering' wordt gedefinieerd als progressieve groei van een tumor homotransplantaat waar dit - gezien de aanwezigheid van antistoffen - niet verwacht zou worden. Het contact van de tumor met de specifieke antilichamen schijnt de tumor juist te beschermen tegen de klassieke afstotingsreactie. Dit effect treedt alleen op bij genetisch niet-identieke gastheer-tumorsystemen, aangezien anders geen humorale antistoffen gevormd zullen worden (90).

In verband met het bovenstaande zal het duidelijk zijn dat voor het verkrijgen van reproduceerbare resultaten met een tumortransplantatiesysteem de hoeveelheid getransplanteerd antigeen materiaal steeds gelijk moet zijn, of, wat veel beter is, het tumor-gastheersysteem geheel vrij moet zijn van antigenen verschillen.

Vooral na hogere stralingsdoses bestaat een tumor, of celsuspensie daarvan, uit slechts enkele overlevende cellen in een overmaat gedode cellen. Voor transplantatie van een gelijk aantal levende cellen is van bestraald tumor-

---

\*In de Angelsaksische literatuur wordt hiervoor algemeen de uitdrukking 'percentage takes' gebruikt.

weefsel dus een grotere hoeveelheid nodig. Indien het tumorsysteem afwijken-  
de transplantatie-antigenen bezit zal dus de relatieve hoeveelheid antigeen  
materiaal bij de verschillende Röntgendoses variëren. Dit maakt dat in een voor  
radiobiologische onderzoeken geschikte tumor-gastheer relatie geen anti-  
geen verschil zal mogen bestaan tussen tumor en gastheer, zodat nòch een af-  
stotingsreactie, nòch groeibevordering de quantitative bepaling van de stral-  
lingsschade aan de tumor zal kunnen beïnvloeden.

De consequentie hiervan is dat het tumor-gastheersysteem zorgvuldig on-  
derzocht dient te worden op het bestaan van antigene verschillen.

Het aantonen van antigene verschillen tussen tumoren en gastheer

Voor het testen van een tumor op de aanwezigheid van eventuele afwij-  
kende transplantatie-antigenen ten opzichte van de gastheer is het gebruike-  
lijk om het gedrag van de tumor na inoculatie in een groep onbehandelde die-  
ren te vergelijken met dat in een groep dieren waarvan de immuunreactiviteit  
is gemodificeerd. Dit kan geschieden door een mogelijke afweerreactie te ver-  
sterken door de dieren tegen de tumor te immuniseren, of juist door eventuele  
immuunreacties te verminderen. Een en ander kan op verschillende manieren  
tot stand worden gebracht;

- 1<sup>e</sup> door immunisatie van de gastheer
- 2<sup>e</sup> door (tijdelijke) onderdrukking van een eventuele immuunreacties
- 3<sup>e</sup> door (tijdelijke) bescherming van het inoculum tegen eventueel gevorm-  
de antilichamen
- 4<sup>e</sup> door het inoculum in een immunologisch 'afgeschermd' milieu te enten.

De verschillende procedures zullen achtereenvolgens worden besproken.

Ad 1. Er bestaan diverse methoden om een proefdier te immuniseren tegen mogelijke  
(tumor) transplantatie-antigenen. Een van de meest gebruikelijke daarvan is,  
om het proefdier één of meerdere malen te inoculeren met 'onschadelijk' ge-  
maakt tumorweefsel. Dit 'onschadelijk' maken kan onder meer geschieden door  
verhitten of door herhaald bevrozen en ontdooien, maar de laatste jaren komt  
steeds meer in zwang om hiervoor een hoge dosis Röntgenstralen (10.000 rads)  
te gebruiken.

De aldus zwaar bestraalde cellen\* kunnen nog geruime tijd hun metabole func-  
tie in stand houden (90), terwijl toch hun celdelingscapaciteit geïnactiveerd  
is. De beste immunisatie verkrijgt men door enkele keren achtereen te inocu-  
leren, met tussenpozen van ongeveer een week. Voor tumoren welke van na-  
ture gedissemineerd groeien, zoals leucaemieën is deze methode van immuni-  
satie vrijwel de enige mogelijkheid. Toch lijkt deze wijze van immuniseren -  
zelfs al zou men per keer 1 gram antigeen weefsel toedienen - minder efficiënt  
dan de thans te bespreken manier. Bij deze methode wordt een proefdier tegen  
een tumor geïmmuniseerd door de tumor eerst te laten groeien en na het berei-  
ken van een zekere grootte (ongeveer 1 gram) te verwijderen, bijvoorbeeld door

\*In de Angelsaksische literatuur worden deze Heavily Radiated of H.R. cellen genoemd. Vanwege  
de beknoptheid verdient ook in de Nederlandse literatuur de uitdrukking H.R. cellen de voor-  
keur.

afbinden van de tumor (39). Het individu is dan in een zeer intensief contact geweest met het antigeen, een toestand die ideaal geacht wordt voor het ontstaan van immunoreacties (57). Ongeveer één à twee weken na het verwijderen van de tumor is de afweerreactie van de gastheer maximaal, zodat dit het tijdstip is waarop de 'test' inoculatie dient plaats te vinden. Zelfs een zeer geringe antigeniciteit van de tumor ten opzichte van de gastheer zal hierdoor kunnen resulteren in een afstoting van een vers, klein inoculum.

- Ad 2. De afweerreactie van de gastheer ten opzichte van het tumorinoculum kan op verschillende manieren onderdrukt worden. Het meest wordt hiertoe gebruik gemaakt van totale lichaamsbestraling van het proefdier met een sublethale dosis tussen de 250 en 400 rads vlak voor de inoculatie. Hierdoor wordt naast het haematopoëtische ook het lymfoïde apparaat grotendeels vernietigd en het kan enige weken duren, voordat de schade hersteld is. In deze periode is dus de gastheer niet in staat om voldoende te reageren tegen antigenen en zal men dus bij het bestaan van antigenen verschillen tussen tumor en gastheer en een snellere groei van het inoculum, resp. een hoger percentage aangeslagen tumoren na inoculatie van minimale hoeveelheden tumorcellen waarnemen.

Het effect van de totale lichaamsbestraling bestaat echter niet alleen uit de onderdrukking van de afweerreactie, maar ook uit verstoring van vele andere functies. De algemene conditie van totaal bestraalde dieren zal dus afwijken van die van een controle groep en wanneer er enig verschil in groeisnelheid van de tumor gevonden wordt, behoeft dit niet persé te betekenen, dat het tumorsysteem afwijkende transplantatie-antigenen bezit.

Wanneer men echter na inoculatie van een gelijk aantal tumorcellen bij de bestraalde dieren significant méér tumoren vindt dan in de controle groep, dient men op zijn hoede te zijn voor antigenen verschillen tussen tumor en gastheer. Onderdrukking van immunoreacties door toediening van corticosteroiden is gebruikelijk, onder andere bij heterotransplantatie van tumorweefsel in hamsters. Uit de kliniek is echter bekend, dat cortison een remmende invloed kan hebben op de groei van sommige tumoren en het lijkt dus weinig aantrekkelijk, om deze methode te gebruiken voor het onderdrukken van immunoreacties van de gastheer. Ditzelfde argument geldt in nog sterkere mate voor de cytostatica zoals imuran, cyclophosphamide etc. die de immunoreactiviteit effectief onderdrukken, maar daarnaast een directe invloed op de groei van tumoren hebben.

- Ad 3. Bescherming van het inoculum tegen afweerreacties van de gastheer door toevoeging van een overmaat H.R. cellen\* kan als één van de verklaringen voor het 'Révész-effect' worden gezien (90). Révész toonde aan (eerst bij het Ehrlich ascites carcinoom, daarbij bij een 1e generatie C<sub>3</sub>H mamma carcinoom en bij enkele door methylcholanthreen geïnduceerde tumoren), dat de groei van

---

\*Zwaar bestraalde of H.R. cellen, zie voetnoot blz. 16.

tumoren gestimuleerd werd dooraan het inoculum een overmaat H.R. cellen toe te voegen.

Het 'Révész-effect' blijkt niet voor alle tumor-transplantatiesystemen te gelden, en de interactie gastheer//inoculum// H.R. cellen staat velerlei interpretaties toe. Behalve een beschermend effect op het inoculum door het absorberen van eventueel antilichaam is ook gesuggereerd, dat in niet-antigene systemen de H.R. cellen als een 'feeder layer' zouden kunnen dienen voor de vitale cellen\*, of dat er van de zwaar bestraalde cellen een stimulering van het metabolisme van de onbestraalde cellen zou uitgaan (Révész, (90).

- Ad 4. Het inoculum kan ook beschermd worden door dit te enten in een milieu, waarin de immunologische afweer niet of minder sterk tot zijn recht komt. Dit is bijvoorbeeld het geval, wanneer de tumor wordt geënt in een diffusiekamer, in de voorste oogkamer of in de wangzak van de hamster\*\*. Met behulp van deze technieken is heterotransplantatie mogelijk, het gebruik ervan wordt doorgaans ook daartoe beperkt.

### Grootte van het inoculum

Eerder werd vermeld, dat de grootte van het inoculum een rol kan spelen bij het al of niet 'aanslaan' van een tumor in aanwezigheid van een zwakke immunoreactie. Dit houdt in, dat bij het transplanteren van tumorfragmenten met behulp van een trocar (waarbij doorgaans meer dan een miljoen cellen worden getransplanteerd), een geringe afweerreactie van de gastheer onopgemerkt kan blijven. Indien men een minimale immunoreactie tegen de tumor op het spoor wil komen, zal de grootte van het inoculum daarom verminderd moeten worden, iets wat meestal geschiedt door verdunning van de - te inoculeren - celsuspensie. Naarmate het aantal geïnoculeerde tumorcellen per dier minder wordt, zal ook het percentage 'dieren met tumor' afnemen en uiteindelijk nul worden. Men kan uit de op deze wijze verkregen resultaten het aantal cellen berekenen, dat nodig is om 50% 'dieren met tumor' op te leveren. Met deze zogenaamde tumorcel-'titratie' of 'Hewitt type assay' (54) wordt dus de gemiddelde gevoeligheid van de proefdierenpopulatie voor het inoculum bepaald. Het is duidelijk dat ook andere dan immunologische factoren (algemene conditie van de gastheer, celviabiliteit in een nieuw milieu, etc.) soms van invloed zijn op de minimale grootte van het effectieve inoculum.

Verschillen in gevoeligheid van de proefdieren kunnen worden uitgedrukt als verschillen in grootte van de inocula die nodig zijn om in 50% van de gastheren in tumorgroei te resulteren. Een alternatieve mogelijkheid om verschillen in gemiddelde gevoeligheid op het spoor te komen is door na te gaan of het verschijnen van de tumor na inoculatie vertraagd is (93); dit zal bijvoorbeeld

---

\*Een 'feeder layer' wordt gebruikt in de weefselkweek en bestaat uit een laag H.R. cellen op de bodem van een kweekbakje. Het is Puck en Marcus (87) als eersten gelukt, om individuele cellen tot clonen te laten uitgroeien door ze in combinatie met een dergelijke 'metabool ondersteunende' (stimulerende?) feeder layer te enten, in plaats van direct op de bodem van een bakje.

\*\*Voor referenties zie Tabel II.

het geval zijn als een gedeelte van de getransplanteerde tumorcellen door een immunreactie geïnactiveerd wordt.

## Transplantatie technieken

In het eerste gedeelte van dit hoofdstuk werden enige methoden genoemd, die gebruikt worden om tumorweefsel te transplanteren. Aangezien - voor zover de auteur bekend - in de laatste jaren geen overzichten gepubliceerd zijn over de verschillende tumortransplantatie-technieken, maar deze toch herhaaldelijk in dit proefschrift ter sprake komen, lijkt een beknopte samenvatting hierover op zijn plaats. Eerst zal de aard van het transplantaat besproken worden, daarna de plaats van inoculatie.

### Het transplantaat

Tumoren die in ascites-vorm groeien hebben voor quantitative transplantatie het grote voordeel dat de cellen tijdens de groei van de tumor in het proefdier reeds in een vloeibaar medium gesuspenseerd zijn. Hiertoe behoren onder meer het Ehrlich ascites carcinoom (63) en het P 388 lymfoom (6) die beide voor radiobiologische onderzoeken gebruikt zijn. Transplantatie geschiedt dan eenvoudig door enig ascitesvocht van de donor in een injectiespuit op te zuigen en in de peritoneaalholte van de ontvanger te injecteren. Indien een ascites-tumorcellensuspensie elders in een gastheer wordt ingespoten ontstaat ter plaatse een solide tumor (14).

De groei van de meeste experimentele leucaemieën of lymfosarcomen, die intraveneus of intraperitoneaal worden getransplanteerd, is gewoonlijk niet ge-localiseerd in het perifere bloed. Er ontstaan onafhankelijk van de plaats van inoculatie, leucaemische infiltraten in lever, milt en lymphklieren (55, 77). De leucaemische cellen zijn daaruit zeer gemakkelijk te isoleren, door de lever of milt fijn te knippen en de aldus verkregen brokjes fijn te wrijven in een geschikt medium. Op deze wijze heeft onder meer Hewitt zijn originele experimenten verricht om de celoverleving van een muize-leucaemie na bestraling te bepalen (59).

Voor de transplantatie van solide tumoren is een uitgebreider instrumentarium vereist. De transplantatie van de tumor als geheel buiten beschouwing gelaten is het meest gebruikelijk om de tumor in kleine stukjes te knippen en deze laatste met behulp van een trocar te implanteren. Andere chirurgische technieken kunnen natuurlijk ook worden gebruikt. Een originele en eenvoudige wijze van transplantatie werd beschreven door Feder (37). Deze methode maakt gebruik van een schoenmakersnaald, die in zijn geheel door de tumor wordt gereden. In het oog van de naald blijft genoeg tumorweefsel hangen om, wanneer de naald vervolgens door de subcutis wordt gereden, succesvolle transplantatie mogelijk te maken.

Een speciale methode om verspreiding van de tumorcellen in de subcutis van de gastheer te vermijden werd ontwikkeld door Thomlinson (108). Brokjes tumorweefsel werden daartoe verpakt in een soort 'worstje', bestaande uit een stukje darm.

De tot zover beschreven methoden voor het overbrengen van solide tumoren zijn niet geschikt voor quantitative transplantatie; een suspensie van tumorcellen is hiervoor wel bruikbaar. In de vorige decennia zijn enkele methoden gepubliceerd, waarbij op zuiver mechanische wijze het tumorweefsel tot een suspensie gemaakt wordt. De methode volgens Craigie (25) maakt gebruik van een soort 'weefselpers'; in de 'cytosieve' volgens Snell (99) wordt het tumorweefsel in een rubber huls gekneeden vervolgens door een zeef geperst. Het percentage levende cellen, dat met deze methoden wordt verkregen is gering; de opbrengst bestaat grotendeels uit cel débris (76). Inoculatie van de tumorsuspensie kan echter geschieden met behulp van een injectiespuit en dit is een belangrijke vereenvoudiging van de transplantatieprocedure.

TABEL II

OVERZICHT BETREFFENDE DE VERSCHILLENDE MOGELIJKHEDEN

	Inoculatie	Resulterende tumorgroei	Auteur	
	subcutaan	flank staart oor schedel 'venster'	solide tumor lokaal " " " "	vele auteurs Van Dongen Suit en Shalet zie hoofdstuk Algire
	intramusculair	poot	solide tumor lokaal	v.d. Brenk
	intramedullair	femur	solide tumor lokaal	Ingali
	intraperitoneaal	-	multiële mesenteriale metastasen	-
isoloog of homolog	intraveneus	staartvene	multiële longmetastasen	-
	intraoraal	trachea	multiële longmetastasen	Epstein
	intra-lymfatisch	testis	regionale metastasen	Wallace
	intracerebraal	-	solide tumor intracerebraal	Prince
	interparenchymateus	nier ovarium testis	solide tumor lokaal "	Gullino en Grantham Young
	intra-ortaal	-	lever metastasen	Fisher
	in diffusiekamer	(buikholte)	tumor in kamer	Algire
	in luchtzak	(subcutis)	multiële locale tumornoduli	Hewitt
Heteroloog	intraveneus of lokaal op chorio-allantoïs membraan		multiële noduli op chorio-allantoïs membraan	Smeulers
	in submucosa van de hamsterwangzak		solide tumor lokaal	Goodall
	in voorste oogkamer van knaagdieren		"	Greene



Het gebruik van enzymatische procedures voor het verkrijgen van suspensies van geïsoleerde cellen is de laatste jaren steeds meer in gebruik gekomen (76,13). Quantitatieve transplantatie is hiermede goed mogelijk en dit is van voordeel voor radiobiologisch onderzoek met tumoren. In het volgende hoofdstuk wordt hierop nader ingegaan.

### De transplantatie

Transplantatie van tumorweefsel is een te algemeen gebruikte procedure in het kankeronderzoek om alle auteurs die hiervan gebruik maakten te kunnen noemen. Daarom zal worden volstaan met een zo volledig mogelijk overzicht van de diverse localisaties waarin solide tumoren werden geïnoculeerd, waarbij per localisatie slechts naar één representatieve publicatie wordt verwezen.

### TOT TRANSPLANTATIE VAN SOLIDE TUMOREN

Ref.	Opmerkingen
(29) (105)	Quantitatieve transplantatie mogelijk. Groei afhankelijk van omgevingstemp. Volume meting goed uitvoerbaar
(2)	Uitwendig zichtbare vascularisatie van de tumor goed te observeren
(14) (64)	Model voor metastasering in het beenmerg
(35) (114) (86)	Quantitatieve transplantatie mogelijk.
(49) (120)	Metingen van de weefseldruk in de tumor
(38) (4) (53)	Tumorcellen geïsoleerd in gastheer
(96) (44) (46)	Heterotransplantatie van menselijke tumoren

Deze gegevens zijn gerangschikt in Tabel II en een korte samenvattende bespreking wordt gegeven in de volgende paragrafen.

Zonder twijfel is de meest gebruikte localisatie voor een experimentele solide tumor het subcutane weefsel van de flank. Andere localisaties zijn echter soms van voordeel. Wanneer het tumorweefsel subcutaan in de staart wordt geënt, blijkt de groeisnelheid van de tumor sterk afhankelijk te zijn van de temperatuur van de omgeving. Zo vond van Dongen (29) dat de groeisnelheid van de tumor in de staart toenam wanneer de staart (met tumor) subcutaan werd geïmplanteerd. Als men - zoals ons is gebleken - proefdieren met een tumor in de staart in een koud vertrek (4°C) plaatst, verloopt de groei van de tumor dusdanig langzaam, dat deze methode in aanmerking komt om een tumor een half jaar te 'conserveren'.

Subcutane localisatie in de oorschelp, zoals werd gebruikt door Suit en Shalek (105) voor een C<sub>3</sub>H mamma carcinoom, maakt een nauwkeurige volumemeting mogelijk. Het is ons echter niet gelukt om het rhabdomyosarcoom BA 1112 (zie hoofdstuk III) op deze plaats te laten groeien. De reden hiervoor zou gezocht kunnen worden in de verschillende afkomst van de tumoren, maar mogelijk speelt zelfs het warme klimaat van Texas hierin een rol!

Voor nauwkeurige externe observatie van het vascularisatie-patroon van tumoren ontwierp Algire eensysteem, waarin men door een venster de tumorgroei in de subcutis kon volgen. In hoofdstuk VI zal hierop nader worden ingegaan, evenals op de resultaten, verkregen met de originele methode van Gullino en Grantham. Bij deze laatste methode wordt het tumorweefsel geïnoculeerd in het nier- of ovarium-parenchym. Dit parenchym wordt geheel door tumorweefsel vervangen, het vaatstelsel wordt echter niet essentieel aangetast. Het bleek mogelijk, om de tumoren door één toevoerend en één afvoerend vat van bloed te laten voorzien en metingen te verrichten omtrent de hoeveelheid bloed, welke de tumor passeert.

Het is duidelijk dat sommige maligne tumoren regionale 'metastasen' zullen vormen na inoculatie in een daartoe gunstige localisatie. Daarentegen is het echter ook mogelijk om uitzaaiing tegen te gaan, door de tumor in zogenaamde diffusiekamers te laten groeien. Deze bestaan uit twee schijfjes van millipore materiaal, die op enkele millimeters afstand van elkaar gevat zijn in een cilindervormige houder (4). Daar er in deze situatie slechts een humorale- en géén cellulaire interactie mogelijk is tussen tumor en gastheer, wordt dit systeem soms ook gebruikt ter vermindering van cellulaire immunoreacties.

Voor de volledigheid werden de localisaties, die voor heterotransplantatie gebruikt worden, tevens in Tabel II opgenomen.

Dit zijn de chorio-allantoïsmembraan van een bebroed kippenei, de submucosa van de wangzak van de hamster en de voorste oogkamer van knaagdieren.

In het volgende hoofdstuk zal ter sprake komen welke van al deze transplantatietechnieken en localisaties werden verkozen voor onze radiobiologische onderzoeken.

## Groei van tumoren

Vrijwel ieder die op oncologisch gebied werkt wordt regelmatig geconfronteerd met de verschillende aspecten van de groei van tumoren. Dit geldt met name voor onderzoekingen waarbij gebruik wordt gemaakt van één van de zojuist beschreven transplantatie-technieken, voor volume-metingen aan tumoren al dan niet in combinatie met bestraling en voor bepalingen van de 'latente periode' van een tumor.

In verband met het in dit proefschrift beschreven onderzoek is enkele malen gebruik gemaakt van groeimetingen om o.a. informatie te verkrijgen over de aanwezigheid van eventuele antigene verschillen tussen tumor en gastheer, over het tijdstip van verschijning van de tumor na inoculatie en t.a.v. de regressie van de tumor na bestraling.

Het lijkt dus wenselijk om, aansluitend op de bespreking van de verschillende aspecten van het gebruik van experimentele tumoren in de radiobiologie ook enkele eigenschappen van de tumorgroei te belichten. Dat de meeste tumoren met de tijd in volume toenemen is bekend en als eenvoudigste model hiervoor kan gelden dat alle maligne tumorcellen zich delen, zodra hun metabole conditie dit toestaat. Uit iedere tumorcel zullen 2 cellen ontstaan, hieruit bij de volgende delingen 4, 8, etc.

Het volume van de tumor zal derhalve exponentieel met de tijd toenemen, indien geen andere factoren interfereren.

In de volgende paragrafen zal nader worden ingegaan op de technieken welke worden gebruikt voor het meten van tumorgroei en op de vraag of de uiteindelijke groei van een tumor al dan niet exponentieel verloopt.

### Meting van het tumorvolume

Er zijn verschillende technieken beschreven om de groei van een tumor te kunnen meten, in de kliniek zowel als in het dierexperiment.

Wanneer men het volume van een tumor nauwkeurig wil bepalen, is het uitprepareren van de tumor een essentiële voorwaarde. Men kan dan gewicht of volume bepalen door middel van wegen of dompelen. Dit houdt echter in, dat men slechts een éénmalige bepaling kan verrichten, waarmede dus de mogelijkheid vervalt om van een individuele tumor de toename in grootte te meten. Dit nadeel kan in experimentele systemen soms gecompenseerd worden door het gebruik van grote aantallen proefdieren, waarin de tumor dan natuurlijk zeer uniform moet groeien.

Om van individuele tumoren op regelmatige tijden de grootte in situ te registreren kan worden volstaan met de bepaling van enkele lengtematen. Het is ook mogelijk de grootte van (oppervlakkige) subcutane tumoren volumetrisch te bepalen, bij voorbeeld door het maken van gips- of plastic replica's (113). Ook zijn enkele plethysmografische methoden beschreven, waarbij men de tumor een hoeveelheid vloeistof laat verdringen, waarvan het volume in een gecalibreerde pipet kan worden afgelezen (27).

De meeste auteurs echter bedienen zich van een meetsysteem, waarbij één of meer afmetingen van de tumor in millimeters worden bepaald. Sommigen be-

rekenen daaruit het volume van de tumor, maar veelal wordt eenvoudig als maatstaf de gemiddelde diameter gebruikt. Voor tumoren, welke min of meer in een plat vlak groeien, zoals huidtumoren of subcutane metastasen van menselijke tumoren, is het gebruikelijk om de oppervlakte in  $\text{mm}^2$  uit te drukken, berekend uit twee loodrecht op elkaar staande diameters. (Deze laatste worden meestal gemeten met een schuifmaat). Wanneer een tumor vrij kan expanderen in losmazig weefsel (longmetastase, subcutane enting van een experimentele tumor), zal de vorm bij benadering bolrond kunnen zijn en wordt de meting van het volume aanzienlijk eenvoudiger en kan b.v. geschieden door middel van een kaliber.

Deze methode wordt gebruikt voor het bepalen van de grootte van longmetastasen op een Röntgenfoto (15) of van subcutane tumoren (31).

In de praktijk zal het weinig uitmaken welk meetsysteem men gebruikt; de moeilijkheid ligt niet zozeer in de meting van de juiste afstand tussen de grenzen van de tumor, maar in de objectieve bepaling van die begrenzing. De randen van een schaduw op een Röntgenfoto zijn soms vaag en moeilijk te bepalen, bij het meten van de grootte van tumoren *in situ* wordt het overliggende weefsel (meestal huid en subcutis) altijd enigszins gecomprimeerd en wel door verschillende onderzoekers in verschillende mate. Het verdient dus aanbeveling dat een serie metingen aan een tumor door dezelfde onderzoeker wordt verricht. Het gebruik van een kaliber met een serie gaten of cirkels bevordert de reproduceerbaarheid der metingen.

Er dient de nadruk op te worden gelegd dat bovengenoemde meetmethoden betrekking hebben op tumoren boven een bepaalde grootte. Aan dit stadium is echter een periode van groei op microscopische schaal voorafgegaan. Het is nog niet mogelijk gebleken, in deze periode volumemetingen te verrichten.

### Vorm van de groeicurve

Wanneer in een tumor geen differentiatie\* optreedt van de tumorcellen zal elke tumorcel zich delen, zodra zijn metabole conditie dit toestaat\*\*. Het volume van een tumor zal verdubbeld zijn, als alle cellen zich éénmaal gedeeld hebben. De term 'tumorvolume verdubbelingstijd' wordt meestal gebruikt als maatstaf voor de snelheid, waarmee dit gebeurt. Deze term spreekt voor zichzelf.

Het is duidelijk, dat indien alle tumorcellen zich regelmatig zouden delen, de groei exponentieel\*\*\* verloopt; per tijdseenheid zal dan het aantal cellen toenemen met een constant gedeelte van het aanwezige aantal cellen.

Wanneer men de groei grafisch weergeeft op semi-logaritmische schaal (log diameter of log volume op de ordinaat, de tijd lineair uitgezet op de abscis), verkrijgt men een rechte lijn. Mayneord (78) was de eerste, die een af-

\*De term 'differentiatie' dient in dit verband te worden gezien als het zich definitief onttrekken van een zeker gedeelte der tumorcellen aan de prolifererende celpopulatie.

\*\*Variaties in de duur van de celdelingscyclus van verschillende cellen in hetzelfde milieu, zoals b.v. worden gevonden in weefselkweek zijn buiten beschouwing gelaten.

\*\*\*Exponentiële groei zal ook gevonden worden, wanneer een constant percentage van de tumorcellen regelmatig deelt.

wijking van deze regel vond; in zijn experimenten betreffende het Jensen sarcoom van de rat verliep de groei niet exponentieel. Wanneer hij de lengte van de tumor (traject 5 tot 50 mm) op lineaire schaal uitzette tegen de tijd, vond hij een lineair verband. Via berekeningen kwam hij tot de conclusie, dat alleen de cellen in een oppervlakkige laag van de tumor regelmatig in deling zijn. Men zou in dit verband dus beter kunnen spreken van een groeiende schil van tumorweefsel. Een lineair verband tussen tumordiameter en tijd werd ook door andere auteurs gevonden; het meest recente werk van Thomlinson (109) toont dit zeer duidelijk.

Anderen vinden daarentegen wèl een exponentiële toename van het tumorvolume (of de diameter); o.a. Collins (24) en Breur (15). Beiden verrichtten metingen aan tumormetastasen (traject 5 tot 100 mm diameter), waarvan de grootte was af te lezen op Röntgenfoto's. Ook uit het fraaie experimentele werk van Suit c.s. (105), die met behulp van een prepareermicroscop de volumeveranderingen van een muize-tumor in het oor bepaalden (traject 0,1 tot 100 mm<sup>3</sup>), blijkt een exponentiële groei.

Er zijn dus discrepanties tussen de ervaringen van verschillende onderzoekers. In dit verband is een mededeling van Welin c.s. (116) van belang; hij kon geen antwoord geven op de vraag, of de groei van tumoren (in casu darmtumoren, waarvan de grootte beoordeeld werd door middel van barium contrast foto's) lineair dan wel exponentieel met de tijd verloopt. Hij publiceerde een diagram, waaruit blijkt dat men ook niet kan verwachten significante verschillen te vinden tussen een lineaire en een exponentiële groeicurve wanneer de metingen zich uitstrekken over een gebied van 5 tot 60 mm diameter en er een gemiddelde meet-onnauwkeurigheid van 2 mm is. Beide typen curven kunnen elkaar dan overlappen. Welin oppert dat een groeicurve een logistische of een Gompertz curve zou kunnen zijn, een benadering, die - onafhankelijk van zijn publikatie - ook door Kaalen (66) en Laird (74) werd ontwikkeld\*.

Beide curven \*\* hebben - op lineaire schaal - een min of meer sigmoïde

\*Na het gereedkomen van dit manuscript zijn nog twee publicaties verschenen, waarin de auteurs eveneens tot dergelijke conclusies komen:

Steel, G.G. and Lamerton, L.F. Brit. J. Cancer 20, 1966, 74.

McCredie, J.A., Inch, W.R., Kruuv, J. and Watson, T.A. Growth, 29, 1965, 331.

\*\*Voor de volledigheid volgen hier de formules;

Exponentiële groei; 
$$\frac{V_t}{V_0} = e^{kt}$$

logistische curve; 
$$\frac{V_t}{V_0} = \frac{1+b}{1+be^{-kt}}$$

Gompertz curve; 
$$\frac{V_t}{V_0} = e^{b(1-e^{-kt})}$$

waarin:  $V_t$  is het bereikte volume uit  $V_0$  in tijd  $t$ ;  $b$  en  $k$  zijn constanten.

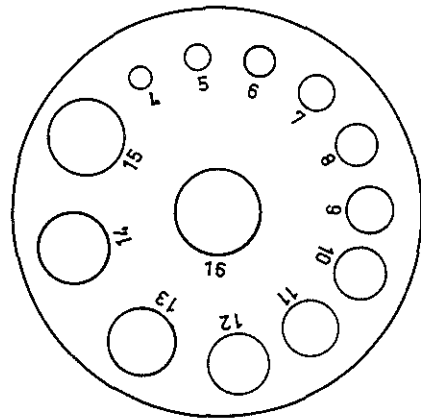
vorm; zij beginnen exponentieel, maar na het bereiken van een bepaald volume neigt het verloop ervan asymptotisch tot een maximum. Het lijkt aannemelijk, dat het verloop van het exponentiële gedeelte van de curve grotendeels bepaald wordt door de (maximale) delingsactiviteit van de tumorcellen en dat het afbuigen van de curve het gevolg is van een aantal beperkende factoren, waarvan de invloed toeneemt naarmate de tumor groter wordt.

Ook de groei van het in dit onderzoek gebruikte rhabdomyosarcoom BA 1112 bleek niet geheel exponentieel te verlopen. Vooruitlopende op de in het volgende hoofdstuk te bespreken transplantatieprocedures lijkt het gewenst om ter illustratie van het zojuist besprokene de groei-curve van deze tumor te behandelen.

### De groei van het rhabdomyosarcoom BA 1112

Een experiment werd verricht met ratten van drie tot vier weken oud. De inoculatie werd verricht met een suspensie\* van 10.000 tumorcellen in 0,05 cc vloeistof volgens Simms in de subcutis van de kop. Na verloop van tijd ontstonden hieruit tumoren.

Met een plastic schijf die was voorzien van een serie gaten, per mm opklim-

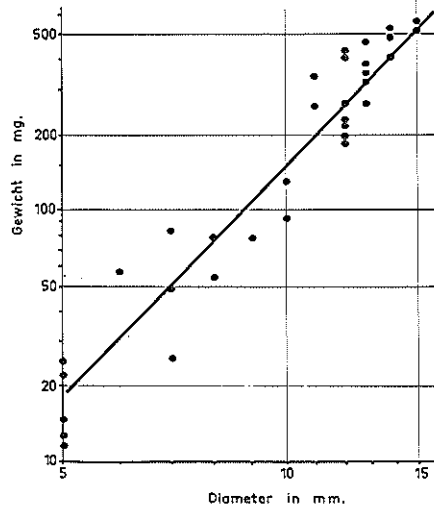


Figuur 5 TEKENING VAN EEN PLASTIC MEETKALIBER.  
De getallen hebben betrekking op de diameter van de gaten in mm.

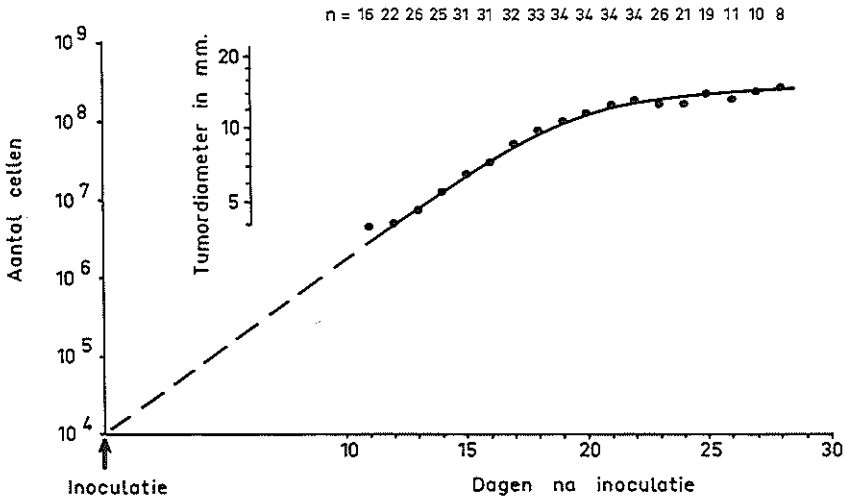
mend van 4 tot en met 16 mm doorsnede (fig. 5) werden de diameters van een aantal tumoren van verschillende grootte gemeten. Daarna werd het dier afgemaakt en de tumor uitgeprepareerd en gewogen. De relatie tussen diame-

\*Voor de celsuspensietechniek en plaats van inoculatie zie het volgende hoofdstuk.

Figuur 6 RELATIE TUSSEN TUMORDIAMETER EN HET GEWICHT VAN DE TUMOR.



ter en gewicht van de tumor is weergegeven in fig. 6. Hieruit blijkt dat de doorsnede van de tumor in het levende dier een redelijk betrouwbare maat is voor het tumorvolume, respectievelijk het aantal cellen in de tumor (tabel VII).



Figuur 7 GROEICURVE VAN TUMOR BA 1112.

Op de ordinaat is aangegeven de gemiddelde diameter van de tumor, tevens het daarmee overeenkomende aantal cellen. Het aantal dieren  $n$  staat bovenaan vermeld. Op de abscis de tijd in dagen. Op dag 0 werden 10.000 cellen geïnoculeerd. In het tweede gedeelte van de curve verloopt de groei niet meer exponentieel.

De groeicurve van de tumor wordt weergegeven in fig. 7. De progressieve toename van het tumorvolume tussende tiende en twintigste dag komt overeen met een exponentiële groei. Het is echter duidelijk dat, wanneer de tumor een diameter van ongeveer 12 mm bereikt heeft, de groeisnelheid afneemt. Dit suggereert dat de groei van dit rhabdomyosaroom inderdaad volgens een Gompertz of logistische curve kan verlopen.

#### Het verloop van de groei van tumoren na bestraling

Uit de experimenten van Suit en Shalek is het mogelijk gebleken om een celoverlevingscurve na bestraling te berekenen via de groeicurven van experimentele tumoren (105). Voorwaarde hiervoor is dat de tumor vóór en na bestraling dezelfde groeisnelheid heeft en dat de volume-toename exponentieel verloopt.

Door terugextrapolatie van de curve na bestraling tot op het moment van de bestraling kan het overlevende 'vitale volume' worden afgelezen. De overlevende fractie kan daarna worden berekend door vergelijking van dit volume met het (gemeten) volume van de tumor op de dag van de bestraling. Men bepaalt met deze methode dus niet direct het percentage overleving voor de gehele populatie, maar dat van de groeiende fractie van de tumor. Het lijkt aannemelijk dat de volumetoename evenredig zal zijn met het gehalte aan cellen die tot ongelimiteerde proliferatie in staat zijn, zodat men de resultaten, verkregen met de zojuist beschreven methode, toepasbaar mag achten op de celoverleving van de prolifererende tumorcelpopulatie.

Breur gebruikte een modificatie van deze methode om uit klinisch materiaal - in casu een aantal op de Röntgenfoto zichtbare longmetastasen - de volumereductie tengevolge van gefractioneerde radiotherapie quantitatief te meten (15). Ook de door Breur verwerkte informatie betreft tumoren met exponentiële groei.

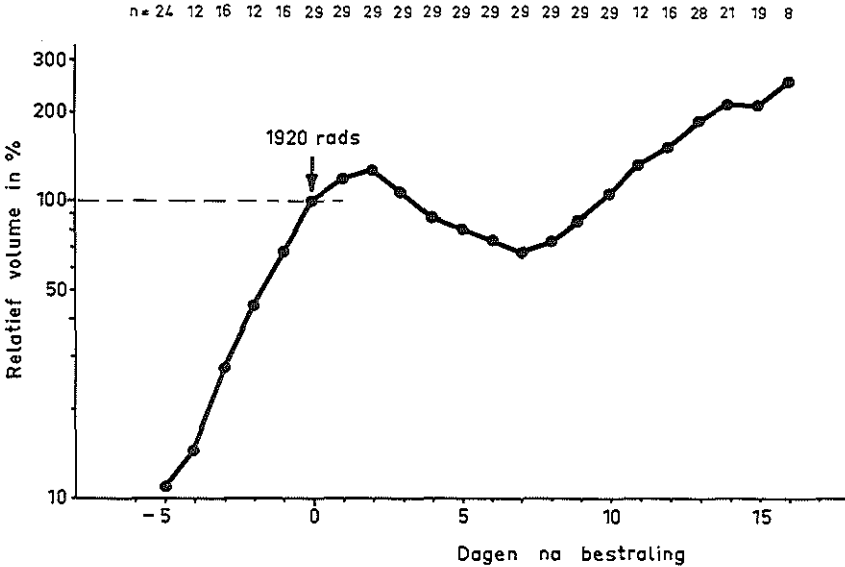
Wanneer de groei van een tumor niet exponentieel verloopt, zoals bijvoorbeeld die van het door Thomlinson gebruikte transplanteerbare fibrosaroom R.1.B.5, zal het niet goed mogelijk zijn om uit de extrapolatie van de groeicurve na bestraling conclusies te trekken t.a.v. de celoverleving.

Thomlinson beperkt zich dan ook voor zijn studie betreffende de invloed van o.a. hyperbarische zuurstof op de stralingsgevoeligheid van tumoren, tot de bepaling van de zuurstofversterkingsfactor. Dit is een zeer bruikbare benadering; hij gebruikt de tumorvolumemetingen dus slechts voor de vergelijking van de verschillende iso-effect doses in afhankelijkheid van de bestralingscondities.

Het in dit onderzoek gebruikte rhabdomyosaroom BA 1112 bleek zich eveneens minder goed te lenen voor een quantitative bepaling van de effecten van bestraling op de groeiende tumorcelpopulatie door middel van volumemetingen; o.a. bleek dat de groei van de tumor na een locale dosis van 1920 rads in de tweede week na bestraling een relatieve vertraging toonde (fig. 8). Misschien is dit het gevolg van stralingschade aan het tumorbed. Terugextrapolatie van het laatste gedeelte van de curve tot het 'overlevende vitale volume' op de dag van de bestraling, doet vermoeden dat de overlevende fractie ongeveer 20% bedraagt, in plaats van ongeveer 1%, de waarde, die werd



bepaald met de tumorceltitratiemethode (hoofdstuk IV). Dit verschil is zonder twijfel voor een belangrijk gedeelte te wijten aan het niet voldoen aan de eerder genoemde eis, dat de groeicurven vóór en na de bestraling evenwijdig dienen te verlopen. Daarom werd dan ook voor het onderzoek betreffende de celoverleving van deze tumor een ander quantitatief systeem verkozen. De techniek daarvan zal het onderwerp vormen van het volgende hoofdstuk.



**Figuur 8 GROEICURVE VAN TUMOR BA 1112 VOOR EN NA BESTRALING MET EEN DOSIS VAN 1920 RADS.**  
 Op de ordinaat het volume van de tumoren in procenten van het volume op de dag van de bestraling. De gemiddelde diameter op dag 0 was 10,5 mm. Het aantal dieren n staat bovenaan vermeld.  
 De groeisnelheid in de tweede week na bestraling is geringer dan vóór de bestraling.

### De groei van microscopisch kleine tumoren

Vóórdat een tumor macroscopisch aantoonbaar wordt, vindt uiteraard eerst een zeer belangrijk groeiproces plaats en de duur hiervan werd door Craigie de periode van microscopische groei genoemd of P.M.G. (26). Aangezien het technisch nog niet uitvoerbaar is om nauwkeurige bepalingen te verrichten van b.v. de de celproliferatie van deze - slechts uit enkele cellen bestaande - tumoren, verdient de uitdrukking 'P.M.G.' de voorkeur boven de benaming 'latente periode'. De P.M.G. kan gedefinieerd worden als: de periode die verloopt tussen het tijdstip van het begin van de autonome groei, metastasering of tijdstip van inoculatie tot het moment, waarop de tumor macroscopisch aantoonbaar is.

Volgens enkele auteurs (21, 26, 62) kan de P.M.G. gebruikt worden om de viabiliteit van tumorcelsuspensies te testen. Steeds werd hierbij subcutaan een

tumorhomogenaat geïnoculeerd, waarvan het 'inoculatie-volume' werd bepaald door middel van centrifugeren. De relatie tussen het 'inoculatie-volume' en de 'P.M.G.' (meestal 4 tot 10 dagen) werd empirisch bepaald. Er bleek een lineair verband te bestaan tussen de logaritmie van het 'inoculatie-volume' en de P.M.G. Het zal duidelijk zijn, dat deze methode om de viabiliteit van een tumorcel-suspensie te testen niet zonder bezwaren is; reeds een geringe verandering van de initiële groei van de geïnoculeerde cellen (b.v. ten gevolge van een voorafgaande behandeling) kan invloed hebben op de resultaten. Bovendien blijkt de P.M.G. soms verkort te worden door de aanwezigheid van een overmaat zwaar bestraalde cellen in het inoculum (21). Deze zojuist genoemde bezwaren hebben ons weerhouden om voor dit onderzoek de P.M.G. te gebruiken als kwantitatieve maatstaf voor de bepaling van de viabiliteit van tumorcel-suspensies. Het systeem van tumorceltitraties volgens Hewitt (54) leek betrouwbaarder en dit werd dan ook voor ons onderzoek verkozen.

Het was natuurlijk interessant om achteraf na te gaan of er een verband was tussen de grootte van het inoculum en de P.M.G. bij onze tumorceltitraties. Inderdaad bleek het tijdstip van verschijnen van een tumor wel enigszins afhankelijk van het aantal geïnoculeerde cellen maar de grote spreiding maakte het weinig aantrekkelijk om de P.M.G. als maatstaf te gebruiken. Toch hebben berekeningen over de groei in deze periode ons onverwacht een beter inzicht verschaft over de wijze waarop de tumorcellen zich bij inoculatie in de subcutis verspreiden. Het betreft berekeningen uitgevoerd door Kaalen over de groeisnelheid van het rhabdomyosaroom.

De grootte van de tumor werd destijds nog niet gemeten met behulp van een meetkaliber, maar wel stonden gegevens ter beschikking over het aantal geïnoculeerde cellen (10, 100 en 1000) en het gewicht van de daaruit ontstane tumoren (100 tot 400 mg). Ook was de tijdsduur bekend tussen de inoculatie en het uitprepareren. Het bleek, dat het gewicht niet direct evenredig was met de grootte van het inoculum, maar met ongeveer de derde machtswortel\* hiervan. Dit zou verklaard kunnen worden door aan te nemen dat de verdeling van de geïnoculeerde cellen in de subcutis aan dit effect ten grondslag lag.

De tumor kan b.v. multicentrisch beginnen en na verloop van tijd kunnen de tumoreilandjes confluëren tot één enkele tumor. Een multicentrische oorsprong van een (geïnoculeerde) tumor is zéér wel denkbaar; indien b.v. 1000 cellen worden geïnoculeerd in een suspensie met een volume van 0,1 ml, zullen deze cellen tezamen ongeveer één honderdduizendste deel van het volume innemen. Er is dus een grote kans dat de cellen sterk verspreid in het weefsel

---

\*De formule, welke Kaalen vond is als volgt:

$$G_t = 5,25 l^{0,29} e^{0,05T}$$

geldig als  $T > 22$  dagen.

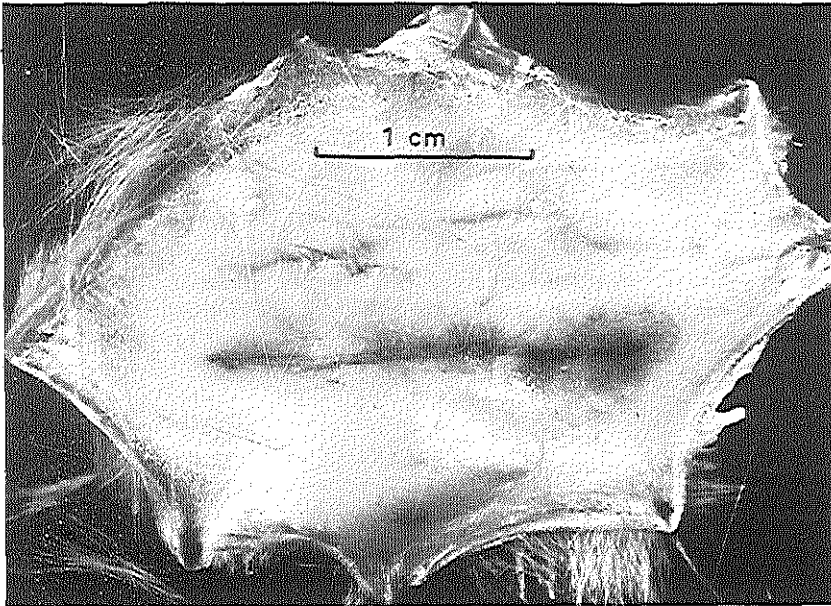
$G_t$  is gewicht van de tumor in mg.

$l$  is het aantal cellen in het inoculum.

$T$  is tijd in dagen na inoculatie

gedeponeerd worden. Eerst werd aan de mogelijkheid gedacht, dat de tumorcellen zich zouden nestelen aan de periferie van de injectie 'quaddel'. Na resorbtie van het medium zouden de tumorcellen zich in een plat vlak bevinden.

Om een inzicht te verkrijgen in de distributie van suspensies in de subcutis werden enkele experimenten verricht. De kooldeeltjes van een subcutane injectie van onverdunde Oostindische inkt bleken zich inderdaad in een schijfje met een doorsnede van omstreeks 8 mm gerangschikt te hebben. Deze localisatie kon voor de statisticus toch geen goede verklaring vormen en hij suggereerde



**Figuur 9** DEMONSTRATIE VAN HET 'NAALDSPOOR' BIJ SUBCUTANE INJECTIE.  
In het subcutane bindweefsel van de kop werd 0,1 ml zeer sterk verdunde Oostindische inkt geïnjecteerd. De foto toont de binnenzijde van de uitgeprepareerde huid.  
De vloeistof van een dergelijke suspensie van kooldeeltjes en water diffundeert in enkele seconden ver in de losmazige subcutis en wordt daar geresorbeerd. De kooldeeltjes daarentegen rangschikken zich lineair volgens het naaldspoor.

reerde alsnog de mogelijkheid te onderzoeken van een distributie volgens een rechte lijn.

Het probleem werd pas opgelost toen het werk van Hewitt onder onze aandacht kwam. Hewitt 'inoculeerde' suspensies van Oostindische inkt in de subcutis van muizen (52). De Oostindische inkt werd door hem zodanig verdund,

dat deze nauwelijks van water was te onderscheiden. Het bleek, dat bij injectie hiervan de vloeistof zich als een quaddel in het losmazige, subcutane bindweefsel verspreidde, maar dat de kooldeeltjes bij de punt van de naald bleven. Dit onverwachte effect leek het gevolg te zijn van filtratie; als gevolg hiervan concentreerden de koolstofdeeltjes uit de sterk verdunde Oostindische inkt zich en werden tezamen als één zwarte stip in het subcutane weefsel zichtbaar. Hiermede was volgens Hewitt een verklaring gevonden voor de algemeen bekende waarneming, dat tumoren die na inoculatie van tumorcellsuspensies ontstaan, meestal vanuit één enkel focus lijken uit te groeien. Het experiment werd door ons herhaald en het bleek, dat de kooldeeltjes zich lineair rangschikten, zoals de statisticus voorspeld had! Of een puntvormige of een lijn-vormige verdeling zal optreden wordt bepaald door de injectietechniek. Het 'naaldspoor' dat door ons bij inoculatie voor tumorcelfiltraties gemaakt wordt, is ongeveer 1 à 2 cm lang (fig. 9).

Het is ons gebleken, dat het beschreven mechanisme alleen opgaat voor een suspensie van deeltjes in een niet-visceus medium; wanneer het medium door de aanwezigheid van colloïden ook maarenigszins visceus is, zoals bij onverdunde Oostindische inkt, vindt geen filtratie plaats, maar extensie van het subcutane weefsel.

Het effect dat cellen in waterige suspensie zich lineair volgens het naaldspoor in de subcutis verdelen en dat daardoor meerdere tumortjes achter elkaar kunnen ontstaan, maakt dat wanneer solitaire tumoren gewenst zijn de inoculatie met grote zorg dient te geschieden. Van deze ervaring werd in dit onderzoek o.a. gebruik gemaakt bij de inoculaties voor de 'curatieve' experimenten.

\* \* \* \* \*

## HOOFDSTUK III

# CELTITRATIES MET RHABDOMYOSARCOOM BA 1112

### Keuze van de tumor

De voordelen van het gebruik van transplanteerbare tumoren voor kwantitatief-onderzoek boven andere typen werden in het vorige hoofdstuk beschreven. In hoofdstuk I werd uiteengezet dat bij het begin van dit onderzoek reeds een aantal gegevens bekend waren over o.a. lymphoïde en ascites tumoren van de muis (tabel I), maar dat het zeer de vraag is of deze gegevens van toepassing zouden zijn op solide tumoren. Dit vormde de reden om te zoeken naar een solide (experimentele) tumor, die bij voorkeur vergelijkbaar zou zijn met de z.g. stralingsresistente tumoren bij de mens. Tot dusverre waren alle cel-overlevingscurven in vivo van tumoren bij muizen bepaald en omdat het voor de extrapolatie van dit soort gegevens naar de mens wenselijk is tumoren van meer dan één diersoort te bestuderen, was het van belang om na te gaan of voor de rat een geschikt tumor systeem kan worden ontwikkeld. Een ander voordeel van deze diersoort leek, dat een opstelling voor locale bestraling eenvoudiger te verwezenlijken zou zijn.

Uit het in het voorafgaande hoofdstuk besprokene zal voldoende duidelijk zijn gebleken dat slechts een tumor, welke ontstaan is in een volledig ingeteelde proefdierstam en welke daarin getransplanteerd kan worden zonder dat immunologische complicaties optreden, in aanmerking komt voor een onderzoek als hier beschreven. Hiervoor kunnen slechts in eigen laboratorium ontstane tumoren worden gebruikt omdat introductie van tumoren uit andere laboratoria op grote bezwaren stuit (o.a. de noodzaak van de import van de bijbehorende proefdierstam).

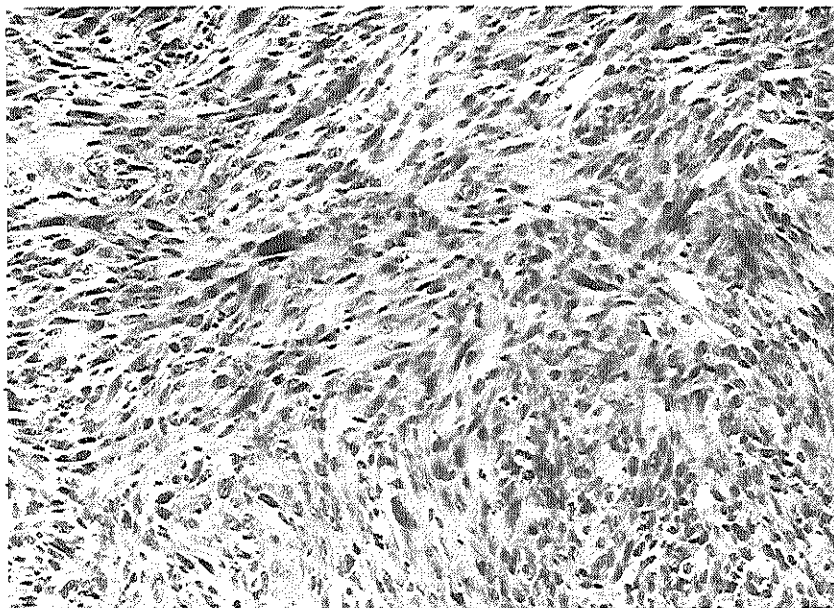
Oorspronkelijk werden twee tumoren van de ingeteelde W.A.G./Rij ratenstam, een rondcellig sarcoom en een adenocarcinoom, die beide in het Radiobiologisch Instituut TNO aangehouden werden, onderzocht op hun transplantatie-eigenschappen. Het bleek echter dat de groei van deze tumoren grote variatie toonde als gevolg van immunisaties. Dit maakte het vrijwel zeker dat deze tumoren op grond van antigenen verschillen onbruikbaar zouden zijn voor ons onderzoek. Het mag dan ook een gelukkig toeval worden genoemd dat in december 1962 bij een W.A.G./Rij rat, behorende tot een groep proefdieren die voor beenmergtransplantatie waren gebruikt, een tumor werd ontdekt die goed transplanteerbaar bleek binnen deze stam.

De oorspronkelijke tumor leek gelocaliseerd in de onderkaaksmusculatuur. De gastheer had omstreeks 8 maanden tevoren een totale lichaamsbestraling

ondergaan van 864 rads gevolgd door een transplantatie van beenmerg afkomstig van Brofo ratten (7). De tumor werd geregistreerd onder nr BA 1112 en bleek geschikt voor dit onderzoek. In de volgende paragrafen zullen de histologie van de tumor, de techniek om cellen uit het tumorweefsel te isoleren en een aantal biologische eigenschappen van deze tumor besproken worden.

## Histologie

Microscopisch werd de tumor geclassificeerd\* als een rhabdomyosarcoom. Het tumorweefsel is opgebouwd uit bundels spoelvormige myoblasten, die in diverse vlakken dooreengeweven zijn (fig. 10). In de tumorcellen konden myo-



Figuur 10 MICROFOTO VAN RHABDOMYOSARCOOM BA 1112.  
De tumor bestaat uit spoelvormige myoblasten, welke in bundels dooreen gevlochten zijn.  
Haematoxyline-eosine x 120.

fibrillen en dwarse streping worden aangetoond met behulp van de phosphorwolframzuur - haematoxyline kleuring volgens Mallory. Typisch voor de tumor is het voorkomen van meerkernige reuscellen. De mitotische activiteit lijkt hoog. De tumor infiltreert op uitgebreide schaal in de omgevende normale

\*M.J. de Vries, persoonlijke mededeling.

weefsels. De primaire tumor was gemetastaseerd in enkele regionale lymfeklieren en de longen; van de getransplanteerde tumoren werden nooit metastasen waargenomen. De experimenten, die in dit proefschrift worden beschreven werden uitgevoerd met de 3<sup>e</sup> tot en met de 20<sup>e</sup> transplantatie generatie. Het aantal passages kon binnen deze grenzen worden gehouden door enkele malen terug te keren tot vroegere tumorgeneraties, die door invriezen waren geconserveerd volgens een techniek die beschreven is voor het bewaren van beenmerg (88). Het invriezen bleek geen invloed te hebben op de transplantatie-eigenschappen van de tumor.

## Onderzoek naar mogelijke antigene verschillen tussen tumor en gastheer

In het vorige hoofdstuk werd uiteengezet dat een tumortransplantatie-systeem dat gebruikt wordt voor dit type radiobiologische onderzoeken, vrij

TABEL III  
DE INVLOED VAN TOEVOEGING VAN ZWAARBESTRAALDE CELLEN  
OP DE EFFECTIVITEIT VAN HET INOCULUM

'vitale' cellen	Inoculum		Aantal dieren met tumor
		HR* cellen	totaal aantal dieren
Experiment A			
10 <sup>3</sup>			4/5
10 <sup>3</sup>	+	3,3 × 10 <sup>6</sup>	5/5
10 <sup>2</sup>			3/5
10 <sup>2</sup>	+	3,3 × 10 <sup>6</sup>	3/5
10			2/5
10	+	3,3 × 10 <sup>6</sup>	0/5
Experiment B			
40			25/30
40	+	40 × 10 <sup>6</sup>	26/28

HR\* cellen zijn tumorcellen van het rhabdomyosarcoom die door bestraling met 9500 rads zijn gesteriliseerd.

dient te zijn van storende immunologische invloeden. Het rhabdomyosaroom BA 1112 is volgens de in hoofdstuk II beschreven richtlijnen bij herhaling onderzocht en zoals uit het volgende blijkt werden géén afwijkingen gevonden in het gedrag van de tumor die op aanwezigheid van storende antigene factoren zouden kunnen wijzen.

Om na te gaan of er een 'Révész effect' aantoonbaar was, werd het aantal dieren dat een tumor ontwikkelde na inoculatie van verschillende aantallen cellen vergeleken met een groep waarbij aan een inoculum van dezelfde grootte een overmaat zwaar bestraalde cellen was toegevoegd (Tabel III). Aansluitend werd nog eens een soortgelijk experiment verricht met een groep dieren die een inoculum ontving van 40 cellen of 40 cellen gemengd met 40 miljoen zwaar bestraalde cellen (Tabel III). Toevoeging van zwaar bestraalde cellen blijkt geen significante toename in het aantal dieren met tumor te geven en hieruit kan dus geconcludeerd worden dat de tumor géén 'Révész effect' vertoont.

Het afbinden van een groeiende tumor ongeveer één week vóór de titratie, bleek evenmin van invloed op de percentages 'dieren met tumor' (Tabel IV).

TABEL IV  
HET EFFECT VAN 'IMMUNISATIE' OP DE EFFECTIVITEIT VAN HET  
INOCULUM

Gastheren	Aantal cellen in het inoculum				
	$10^4$	$10^3$	$10^2$	10	1
onbehandeld	5/5	5/5	3/5	1/5	0/5
'geïmmuniseerd'	5/5	5/5	2/5	1/5	0/4

De getallen in de tabel geven aan het aantal dieren met tumor t.o.v. het totale aantal dieren. De gastheren waren al dan niet geïmmuniseerd door bij hen een groeiende tumor af te binden één week voor de inoculatie.

Ook wanneer het immuunapparaat van de gastheer werd verzwakt door een totale lichaamsbestraling van 240 rads op de dag vóór de inoculatie (Tabel V), bleek het percentage dieren met tumor niet toe te nemen.

Tenslotte werden evenmin overtuigende afwijkingen gevonden in het groei-patroon van de tumor, wanneer een groep proefdieren was geïmmuniseerd door een (afgebonden) tumor (fig. 11) of het immuunapparaat was verzwakt door een totale lichaamsbestraling van 384 rads (fig. 12). In de laatste figuur wordt weliswaar de indruk gewekt dat na de 20e dag enig verschil optreedt, dit is echter niet significant.

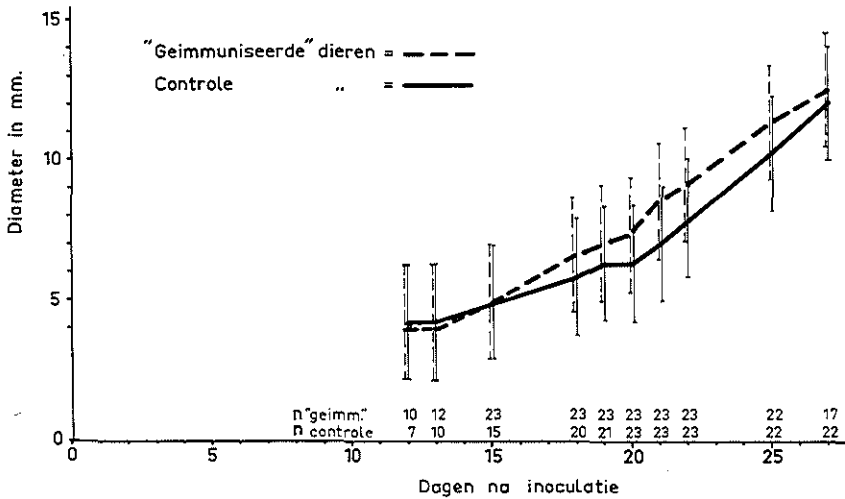


TABEL V

DE INVLOED VAN TOTALE LICHAAMSBESTRALING OP DE EFFECTIVITEIT  
VAN HET INOCULUM

Gastheren	Aantal cellen in het inoculum			
	$4 \times 10^3$	$4 \times 10^2$	$4 \times 10$	4
onbestraald	10/10	3/10	0/10	0/10
bestraald	10/10	4/10	1/10	0/10

De getallen in de tabel geven aan het aantal dieren met tumor t.o.v. het totale aantal dieren. De gastheren ondergingen al dan niet een totale lichaamsbestraling van 240 rads daags voor de inoculatie.



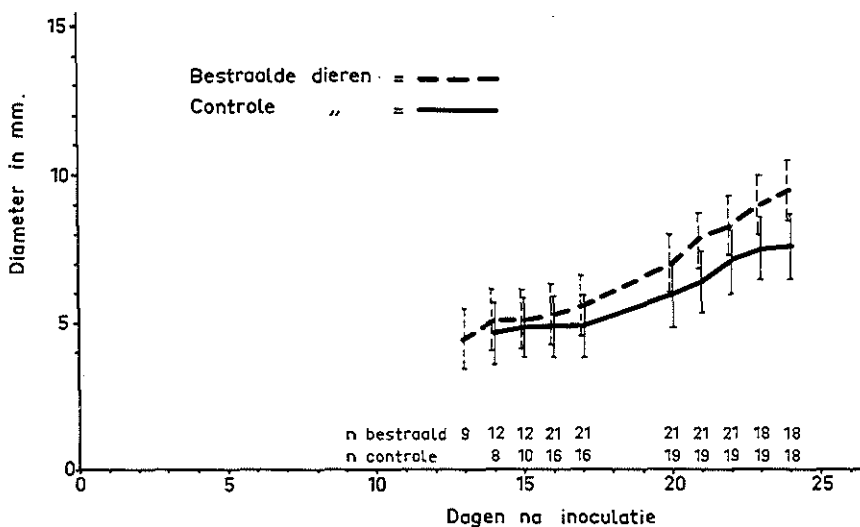
Figuur 11 GROEIPATROON VAN DE TUMOR NA 'IMMUNISATIE'.

Ordinaat: gemiddelde diameter met standaard afwijking van het gemiddelde.

Absciss: tijd in dagen na inoculatie van  $10^4$  cellen.

Er is geen significant verschil in groei tussen geïmmuniseerde- en contrôledieren. De immunisatieprocedure bestond uit het afbinden van een groeiende tumor een week voor de inoculatie.

Figuur 12 GROEIPATROON VAN DE TUMOR IN BESTRAALDE GASTHEREN (384 rads).  
 Ordinaat: gemiddelde diameter met standaardafwijking van het gemiddelde.  
 Abscis: tijd in dagen na inoculatie met  $10^4$  cellen.  
 Er is geen significant verschil in groei tussen immunologisch verzwakte- en controle-  
 dieren.



## "Klinische" stralingsgevoeligheid

Ten einde een indruk te verkrijgen over de stralingsgevoeligheid (of resistentie) van deze tumor werden enkele dieren met een tumor van omstreeks 15 mm diameter bestraald met een dosis van  $30 \times 192$  rads, gegeven in 6 weken. Deze bestraling sorteerde slechts een minimaal effect; de toename van het volume van de tumor (dus de groei) werd slechts tijdelijk geremd. Naat een dosis van 5760 rads (6000 R) was bereikt, werd de bestraling beëindigd en de tumor groeide daarna binnen een maand uit tot een ulcererende massa van enkele centimeters doorsnede.

Volgens dit 'klinische' criterium was het waarschijnlijk, dat de tumor tot de stralingsresistente tumoren moest worden gerekend en mogelijk heeft dit rhabdomyosaroom zelfs een stralingsresistentie vergelijkbaar met de stralingsresistente menselijke rhabdomyosarcomen.

## De bereiding van tumorcelsuspensies

Voor de quantitative transplantatie van de tumor is het noodzakelijk over een methode te beschikken, die voorziet in de behoefte om in een relatief korte tijd op reproduceerbare wijze een aantal monsters van het (al dan niet bestraalde) tumorweefsel te verkrijgen met een bekende hoeveelheid cellen.

Zeer bruikbaar daarvoor is een suspensie van levende tumorcellen, geïso-

leerd uit het tumorweefsel. De concentratie hiervan kan door middel van een telkamer gemakkelijk worden bepaald en het gewenste aantal cellen kan worden verkregen door verdunning.

Onze ervaringen met de zuiver mechanische verkleining van het (vaste) tumorweefsel, zoals dit jarenlang gebruikelijk was bijvoorbeeld door middel van de celzeef van Snell of een weefselpers, zijn in overeenstemming met die van anderen. Een op deze wijze verkregen suspensie bestaat vrijwel geheel uit dode cellen en celdébris.

Sinds een tiental jaren zijn steeds meer enzymatische methoden voor dit doel in gebruik genomen. Het proteolytische enzym trypsine wordt algemeen gebruikt in de weefselkweek en enkele trypsinisatie-procedures voor het dispergeren van tumorweefsel zijn gepubliceerd (13, 76). Deze voldeden echter niet aan de eisen van het type experimenten zoals in dit proefschrift beschreven worden, waarbij soms zeer grote aantallen cellen in een relatief korte tijd ter beschikking moeten komen. Daarom werd enige aandacht besteed aan verbetering van deze technieken. Teneinde de trypsine zo efficiënt mogelijk op het tumorweefsel te kunnen laten inwerken, is het aangewezen om bij het begin van het dispergeren uit te gaan van een brei van kleine brokjes. Solide tumoren bevatten vrijwel steeds een aantal taaiere weefselstrengen, die het fijnknippen met een schaar ernstig bemoeilijken. Daarom werd een eenvoudig 'hakmes'-mechaniek ontworpen, waarvan het gebruik tevens het voordeel heeft dat het weefsel snel en reproduceerbaar in kleine stukjes wordt gehakt.

Men veronderstelt dat door de trypsine in het medium de intercellulaire kitstof\* van de weefselbrokjes wordt opgelost. Er is daarna slechts een geringe mechanische kracht nodig om de tumorcellen uit het weefsel los te maken. Dit gebeurt doorgaans met behulp van een sterke agitatie van het medium, wat met verschillende methoden kan worden bereikt.

De eenvoudigste van deze, zoals herhaaldelijk pipetteren of schudden van het medium in een kolf, zijn niet geschikt, wanneer een grote celopbrengst vereist is. Dit is evenmin het geval bij de elegante methode volgens Boyse (13), waarbij het medium met de daarin gesuspendeerde tumorbrokjes door middel van een vingerpomp wordt rondgepompt in een slang van siliconenrubber. Madden en Burk (76) gebruikten een magnetische roerder in een trypsinisatiekolf (Erlenmeyer met indeukingen), maar onze ervaring leerde dat bij deze methode teveel schuimvorming optreedt. Een belangrijk gedeelte van de celopbrengst kan verloren gaan in dit schuim.

Het in dit hoofdstuk beschreven systeem maakt gebruik van een platte roerder (i.c. scheermesje), welke nauwkeurig in een horizontaal vlak roteert. Hiermede wordt het medium plaatselijk intensief geagiteerd, terwijl de rest van de vloeistof vrij rustig blijft.

Schuimvorming ontstaat door vermenging van lucht en vloeistof en dus aan de vloeistofoppervlakte. Deze laatste werd zo klein mogelijk gehouden door de diameter van de hals van het dispersievat (fig. 13) zodanig te beperken dat

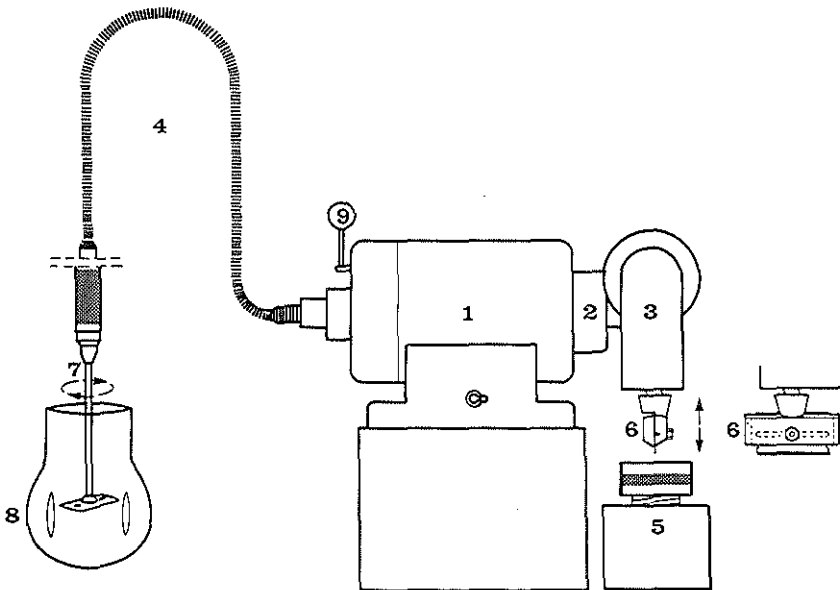
---

\*De samenstelling van de 'intercellulaire kitstof' van deze tumor is niet onderzocht.

het scheermesje nog juist kan passeren. Daarbij wordt, om ongewenste turbulenties aan het oppervlak tot een minimum te reduceren, het vat steeds tot halverwege de gladwandige hals met medium gevuld. In een dergelijk systeem werd aan fosfaatbuffer de voorkeur gegeven; de ervaring leerde nl. dat bij gebruik van een carbonaatbuffer in korte tijd zoveel CO<sub>2</sub> ontsnapt, dat een ernstige verstoring van de zuurgraad optreedt.

### Apparatuur

Voor het mechanische gedeelte van de celdispersiemethode werd een instrument geconstrueerd, dat zowel kan dienen voor het fijnhakken van het tumorweefsel als voor het agiteren van het medium (fig. 13).



Figuur 13 SCHEMATISCHE VOORSTELLING VAN HET 'DISPERSIE'-APPARAAT.

1 motor, 2 wormoverbrenging, 3 excentriek, 4 flexibele as, 5 vijzel, 6 scheermes in houder, 7 roestvrij stalen as met scheermes, 8 dispersie-vat, 9 snelheidsregelaar.

Het centrale gedeelte van het instrument bestaat uit een motor met regelbaar toerental. Deze motor heeft aan beide aseinden de mogelijkheid tot het aanbrengen van hulpstukken. Aan de rechterzijde wordt - via een wormoverbrenging - een excentriek aangedreven, waardoor een verticale as een oscillerende beweging maakt.

Aan deze as wordt een speciale houder bevestigd, waarin een (roestvrij stalen) scheermes past. Dit scheermes maakt aldus een verticale, hakkende beweging, waarvan de snelheid regelbaar is.

Het tumorweefsel bevindt zich onder dit scheermes op een plaatje van siliconenrubber dat weer in een plastic petrischaal ligt. Dit geheel is op de juiste hoogte instelbaar tijdens het hakken doordat het rust op een (zeer solide) vijzel.

Aan de linkerzijde van de motoras is een flexibele as bevestigd, waarvan het uiteinde verticaal is vastgeklemd. In de boorhouder wordt een (roestvrij stalen) asje vastgezet, waaraan een roestvrij stalen scheermesje dwars is bevestigd. Dit laatste kan vrij ronddraaien in een horizontaal vlak in het centrum van een glazen vat van het type, zoals dat geleverd wordt bij de Bühler homogenisator. Een dergelijk glazen vat bestaat uit een cilindrische hals en een bol met 3 keerrribben. De afstand van de rand van het scheermes tot de ribben is ongeveer 3 mm, dit geldt zowel voor de 150 ml als de 400 ml vaten, die voor deze celdispersiemethode gemaakt werden. Zowel de scheermesjes in hun houders, als het siliconenrubber en de glazen vaten worden droog gesteriliseerd.

#### Medium

Het medium, dat gebruikt wordt voor het dispergeren van de brokjes tumorweefsel tot geïsoleerde cellen is een iets gewijzigde oplossing volgens Hanks; Tabel VI geeft de samenstelling. Tevens is in deze tabel de samenstel-

TABEL VI  
SAMENSTELLING VAN DE MEDIA  
(grammen per liter)

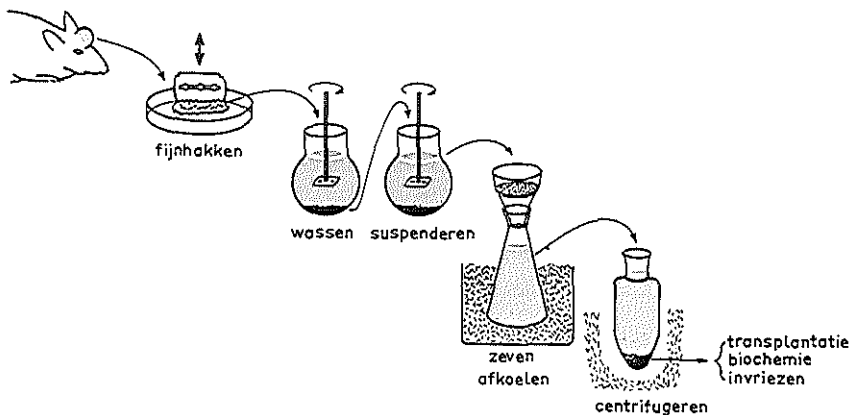
Component	'Hanks met trypsine'	'Simms'
NaCl	7,4	8,0
K Cl	0,2	0,2
CaCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,05	0,147
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,18	0,20
Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O		0,07
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,75	0,35
K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05	
Glucose	1,0	1,0
Phenolrood	0,02	0,05
Trypsine (1/300 NBC)	0,5	
pH na het instellen	7,35	7,0

ling van de oplossing volgens Simms\* vermeld, die gebruikt werd voor het hersuspenderen en verdunnen van de tumorcellsuspensies.

De pH van de oplossingen werd op de gewenste waarde ingesteld door toevoeging van een (gering) volume van een oplossing van 0,5M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Het steriliseren geschiedt door de vloeistof met behulp van stikstof onder een druk van  $\frac{1}{2}$  à 1 atmosfeer door een Seitz asbestfilter te persen. De media worden opgevangen in infusieflessen (250 of 100 ml inhoud) en bewaard bij een temperatuur van  $-20^\circ\text{C}$  tot het tijdstip van gebruik.

### Procedure

Na het uitprepareren en wegen wordt het tumorweefsel met een schaar in stukjes geknipt. Als het type experiment dit noodzakelijk maakt, kunnen deze tot brokjes van 1 à 2  $\text{mm}^3$  worden verkleind met het hakapparaat. Deze procedure duurt slechts enkele minuten. Het tumorweefsel wordt onder het op- en neergaande scheermes gebracht door de petrischaal te draaien en door de brokjes bijeen te houden met een spateltje. De aldus verkregen tumorbrei wordt vervolgens in het dispersievat gebracht en er wordt zoveel medium toegevoegd, dat het dispersievat tot halverwege de hals gevuld is (fig. 14).



Figuur 14 SCHEMATISCHE VOORSTELLING VAN DE CELDISPERSIEPROCEDURE.

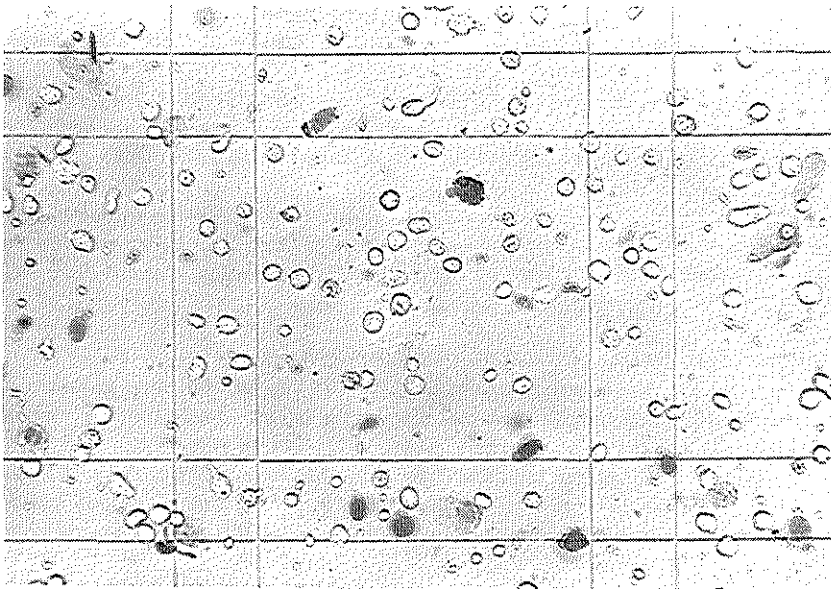
Het dispergeren gebeurt bij kamertemperatuur en de agitatie van het medium, die daarvoor nodig is, wordt verkregen door het scheermesje in het dispersievat gedurende 10 tot 20 minuten met een snelheid van ongeveer 1200 tot 1600 toeren per minuut te laten roteren.

Er kan een enkele keer schuim ontstaan doordat een fibreuze streng welke aan het fijnhakken is ontsnapt, aan het draaiende mes blijft hangen en zodoende de vloeistof teveel in beroering brengt. Een dergelijke streng wordt verwijderd.

\*T.C. Simms X<sub>7</sub> solution, dried (Difco).

Na het dispergeren wordt de inhoud van het vat (zonder de scheermesroerder) gedurende 5 minuten met rust gelaten, teneinde de overgebleven weefselbrokjes te laten bezinken. Dit is in het bijzonder van belang voor de zéér kleine brokjes van enkele honderden cellen. Deze zouden anders gevangen worden in de nylon zeef, waardoor de vloeistof na decanteren wordt gefiltreerd en dus verloren gaan voor een volgende dispersie-gang.

De op deze wijze verkregen suspensie van geïsoleerde cellen wordt snel gekoeld tot omstreeks  $0^{\circ}$  tot  $4^{\circ}$  C in een kolf, die in ijs staat. Op deze wijze wordt de eventueel resterende proteolytische activiteit gestopt. Nadat vers medium is toegevoegd aan de achtergebleven weefselbrokjes wordt doorgaans een tweede dispersiegang ingezet en de opbrengst daarvan bij die van de eerste gevoegd. Vervolgens wordt gecentrifugeerd ( $170 \times g$  gedurende 10 minuten bij  $0^{\circ}$  C) en de celopbrengst die zich dan op de bodem van de centrifugebuis heeft verzameld, wordt geresuspendeerd in ijskoude Simms' oplossing.



Figuur 15 ASPECT VAN EEN CELSUSPENSIE IN EEN TELKAMER.

De donker gekleurde cellen hebben trypaanblauw geabsorbeerd en worden niet als 'levende cellen' meegeteld.

Indien voor bepaalde experimenten een zeer 'schone' celsuspensie is vereist, kan de duur van de eerste suspensiegang tot 3 à 5 minuten bekort worden en na het bezinken van de weefselbrokjes de bovenstaande vloeistof worden weggeschonken. De meeste erythrocyten worden dan mede verwijderd.

## Opbrengst

Na toevoeging van 9 delen 0,02% trypaanblauw in 0,9% NaCl aan één deel van een monster van de suspensie wordt het celaantal bepaald in een telkamer (fig. 15). Slechts ongekleurde cellen worden als intact beschouwd.

Het gehalte aan door trypaanblauw gekleurde cellen bedraagt meestal 10 tot 20 procent.

De juiste celconcentraties voor tumorceltitraties worden verkregen door verdunning in serie in ijsskoude Simms' oplossing. Meestal bedraagt de opbrengst van het rhabdomyosarcoom BA 1112 omstreeks 20 tot 70 miljoen cellen per gram tumorweefsel. Het aantal cellen in het tumorweefsel kan geschat worden op ( $5 \times 10^6$ ) cellen/gram (zie volgende paragrafen) en een gemiddelde oogst van 20 tot 70 miljoen cellen/g betekent, dat de opbrengst ongeveer 10% bedraagt.

## Gebruik van celsuspensies

Wanneer een tumor op de bovenbeschreven wijze tot geïsoleerde levende cellen is gedispergeerd, kan de zo verkregen celsuspensie gebruikt worden voor een groot aantal doeleinden.

Niet alleen heeft een dergelijke suspensie voordelen voor transplantatie van tumoren maar ook leent deze zich bij uitstek voor bepaalde biochemische onderzoeken, alsmede voor het invriezen van levende cellen ter conservering voor een tumorbank.

In hoofdstuk V en VI komen o.a. ter sprake het aantal cellen in het tumorweefsel, alsmede het zuurstofverbruik van de cellen. Daar beide parameters van deze tumor zijn bepaald met behulp van celsuspensies, worden deze experimenten in dit hoofdstuk besproken.

### Bepaling van het aantal cellen in tumorweefsel

Van een suspensie met een bekend aantal cellen kan het drooggewicht of DNA gehalte worden bepaald en b.v. uitgedrukt in een waarde per ( $10^6$ ) cellen. Wanneer overeenkomstige waarden bekend zijn voor de intacte tumor, kan op eenvoudige wijze het aantal cellen per gram tumorweefsel berekend worden.

De resultaten van enkele experimenten ter bepaling van het aantal cellen in het tumorweefsel zijn gerangschikt in Tabel VII. DNA werd bepaald\* met difenylamine volgens Dische (28).

De berekende celaantallen, welke werden gevonden met beide technieken, bevinden zich in dezelfde orde van grootte. Bij de beoordeling van de resultaten, dient echter in aanmerking genomen te worden, dat de celsuspensies nog wel enig 'celgruis' zullen bevatten en dat het tumorweefsel een onbekende (bij deze tumor waarschijnlijk geringe) hoeveelheid intercellulaire substantie zal bevatten, alsmede een wisselende hoeveelheid bloed en necrotische substantie.

---

\*De bepaling werd verricht door H.M. Klouwen en A.M.W. Appelman



TABEL VII

HET AANTAL CELLEN IN HET TUMORWEEFSEL, BEREKEND NAAR GEGEVENS OVER DROOGGEWICHT EN DNA-GEHALTE VAN TUMOR EN TUMORCELSUSPENSIES

Exp.	Celsuspensie		Tumor		Berekend
	Aantal cellen ( $\times 10^6$ )	Drooggewicht (mg per $10^6$ cellen)	Gewicht (mg)	Drooggewicht (mg per gram tumor)	aantal cellen ( $\times 10^7$ ) per gram tumor
I	250	0,28	1525	169	60
"	400	0,23	"	"	73
II	715	0,38	371	191	50
"	825	0,38	"	"	50
		DNA (mg per $10^6$ cellen)		DNA (mg per gram tumor)	
III	186	0,0163	500	7,7	47
"	174	0,0158	"	"	52
"	124	0,0135	"	"	56
IV	26	0,0135	1701	7,5	55
V	160	0,0159	595	7,0	44

Het gemiddelde aantal cellen per gram tumorweefsel zoals getabelleerd in de laatste kolom is  $54 \times 10^7$ . I.v.m. enkele onzekerheden (o.a. het bloedvolume van de tumor in situ en de hoeveelheid intercellulaire substantie) wordt als benadering aangenomen  $5 \times 10^8$  cellen per gram tumorweefsel.

Daarom werd als benadering het aantal cellen per gram tumorweefsel geschat op  $5 \times 10^8$ . Deze waarde is redelijk in overeenstemming met de (zeer grove) schattingen die gebruikt worden in de theoretische radiobiologische literatuur, waarin meestal zonder meer wordt aangenomen, dat een tumor tussen de  $10^8$  en  $10^9$  cellen per gram bevat.

#### Bepaling van het zuurstofverbruik van de tumorcellen

Zoals eerder werd opgemerkt, is de zuurstofconcentratie in het tumorweefsel van groot belang voor de stralingsgevoeligheid. De zuurstofconcentratie in

een weefsel is o.a. afhankelijk van de zuurstofconsumptie van de cellen (zie hoofdstuk VI). Daarom werd het zuurstofverbruik van enkele celsuspensies van het rhabdomyosarcoom bepaald in een Warburg-apparaat. Het suspensiemedium was de met fosfaat gebufferde oplossing volgens Simms, de temperatuur 37°C. De resultaten staan gerangschikt in Tabel VIII; het gemiddelde zuurstofverbruik is 0,023  $\mu\text{lO}_2$  per  $10^6$  cellen per minuut.

TABEL VIII  
HET ZUURSTOFVERBRUIK VAN TUMORCELLEN VAN HET  
RHABDOMYOSARCOOM IN SUSPENSIE

Exp.	Totaal aantal cellen in de suspensie $\times 10^6$	Concentratie (aantal cellen/ml)	Zuurstofverbruik ( $\mu\text{lO}_2/10^6$ cellen/min)
I	300	100	0,026
II	210	70	0,032
III	600	200	0,016
"	300	100	0,021
"	150	50	0,026
IV	270	90	0,021
"	270	90	0,023
"	135	45	0,023
"	135	45	0,030
V	330	110	0,020
"	165	55	0,023
"	300	100	0,015
"	150	50	0,019

Zuurstofverbruik gemiddeld: 0,023  $\mu\text{lO}_2/10^6$  cellen/minuut.

Deze waarde bevindt zich in dezelfde orde van grootte als de gegevens van Warburg (115); een aantal van de getallen die door Greenstein (47) werden verzameld zijn iets hoger.

De conclusie lijkt gerechtvaardigd, dat de zuurstofconsumptie van de cellen, afkomstig van dit rhabdomyosarcoom, weinig verschilt van de waarden die opgegeven zijn voor andere tumoren.

## Tumorceltitratie in vivo

De overleving van tumorcellen na Röntgenbestraling, zoals bepaald met behulp van quantitative transplantatie, zal het onderwerp vormen voor het volgende hoofdstuk. Voor quantitative transplantatie is het noodzakelijk een maatstaf te bezitten waarmee de 'viabiliteit' van de tumorcellen wordt gemeten. Hiervoor wordt meestal gebruik gemaakt van het systeem volgens Hewitt (54), waarin het aantal cellen wordt bepaald, dat nodig is om in de helft van de proefdieren een tumor te doen ontstaan.

Daar deze 50% waarde zelden van tevoren nauwkeurig bekend is, wordt een aantal groepen dieren met zodanig opklimmende celdoses geïnoculeerd, dat verwacht mag worden dat de percentages van dieren met tumor van de verschillende groepen tussen de 0 en 100% zullen variëren.

Deze procedure wordt algemeen 'celtitratie' genoemd en voor de experimenten, die in dit proefschrift beschreven worden, zijn voor de (onbestraalde) celinoculaties aantallen gebruikt van 1, 4, 10, 40, 100, 400 of 1000 cellen per dier (5 tot 10 dieren per celdosis).

In de volgende paragrafen zal nader worden ingegaan op de berekeningsmethode ter verkrijging van de 50% waarde. Het is echter duidelijk, dat deze methode vereist dat grote aantallen proefdieren nauwkeurig en snel met verschillende aantallen cellen geïnoculeerd kunnen worden.

Met het oog op een mogelijke teruggang van de viabiliteit van de tumorcellen door een te langdurig verblijf *in vitro*, werd de duur van de gehele celsuspensie- en transplantatieprocedure beperkt tot maximaal 4 uur.

Als volume voor injectie van de celsuspensie werd 0,1 ml gekozen; het maximum aantal cellen dat zich in 0,1 ml kan bevinden, zonder dat de suspensie te visceus wordt, bedraagt ongeveer 1 miljoen; dit is een concentratie die bij sommige bestralingsexperimenten onvermijdelijk is.

De procedure van de inoculatie moet eenvoudig zijn en voor dit rhabdomyosarcoom werden de volgende mogelijkheden beproefd: intracerebraal, intraperitoneaal, intraveneus, subcutaan. Subcutane injectie werd verkozen omdat deze het snelste kan worden verricht en omdat het proces van de tumor-groei in de overige localisaties moeilijk is te volgen.

Als plaats voor de enting werd de kruin van de rattekop gekozen.

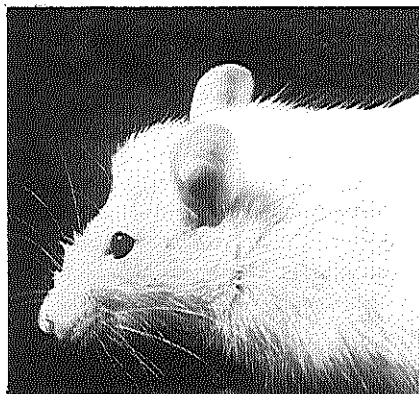
De inoculatie in het subcutane bindweefsel op de kop voldeed aan de eisen van efficiëntie bij de injectie en voorzag in de mogelijkheid om de groei van de tumor te kunnen volgen. Tumoren die op deze plaats ontstaan, lenen zich bovendien bijzonder goed voor locale bestraling.

Fig. 16 toont de kop van een rat, nadat daarop een tumor van 12 mm diameter was gegroeid. Het is duidelijk, dat de inspectie van de rattepopulatie op aanwezigheid van tumor veel eenvoudiger is, dan na inoculatie in de flank van de proefdieren. Voor het 'aanhouden' van de tumor werd gewoonlijk echter wel de flank gebruikt; de tumoren kunnen hier veel groter worden zonder dat het proefdier daarvan hinder ondervindt.

## Bepaling van de ED<sub>50</sub>

Zoals reeds werd vermeld in vorige paragrafen van dit hoofdstuk, wordt als maatstaf voor de viabiliteit van de tumorcellen veelal gebruikt de 'Effectieve (cel) Dosis' die nodig is om in de helft van het aantal gastheren een tumor te doen ontstaan.

Figuur 16 EEN SUBCUTANE TUMOR VAN OMSTREEKS 12 MM DIAMETER. Deze tumor is na inoculatie in het subcutane bindweefsel van de kop gegroeid.



De E D<sub>50</sub> kan in verband met deze onderzoekingen gedefinieerd worden als het aantal tumorcellen dat na subcutane inoculatie op de kop binnen 100 dagen bij 50% van de proefdieren een tumor doet ontstaan en wordt uit de resultaten van de celtitraties berekend. De termijn van 100 dagen werd aangehouden, nadat uit de inleidende experimenten was gebleken dat zelfs uit de kleinste inocula na 80 dagen geen tumor meer te verwachten was.

Voor de berekening van de E D<sub>50</sub> werd de methode volgens Litchfield en Wilcoxon (75) gevolgd. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een ingenieus systeem van nomogrammen; met een minimum aan rekenwerk wordt de heterogeniteit getest van de afwijkingen ten opzichte van de (probit) lijn, waarna de E D<sub>50</sub> met de betrouwbaarheidsgrenzen kan worden berekend. Het is met deze methode eveneens mogelijk om de getallen van verschillende experimenten bijeen te voegen en daarop één enkele berekening uit te voeren. Bij de vergelijking van de resultaten van meerdere experimenten wordt tevens getest of de hellingen van de probitlijnen significant verschillen. De verhouding van de ED<sub>50</sub> waarden wordt met deze methode eenvoudig berekend, alsmede het 95% betrouwbaarheidsgebied hiervan.

De E D<sub>50</sub> waarde toonde tijdens de duur van het onderzoek van omstreeks 2 jaar enige variabiliteit, iets wat gezien de ingewikkelde proefopstelling geen verwondering wekt. Een overzicht hiervan wordt gegeven in Tabel IX: gemiddeld kan de E D<sub>50</sub> voor dit tumor-gastheersysteem op ongeveer 30 cellen worden geschat. Voor de tumorceltitraties werden evenveel manlijke als vrouwelijke ontvangers gebruikt van een leeftijd van 4 à 5 weken (gewicht 50 tot 100 gram). Er werd nooit enige invloed van het geslacht op de tumorgroei waargenomen.

\* \* \* \* \*

TABEL IX  
 FLUCTUATIE IN ED<sub>50</sub> WAARDEN OVER EEN PERIODE VAN 2 JAAR

Maand en jaar	E D <sub>50</sub>	Aantal experimenten
A - M - J 1963	40 cellen	5
J - A - S "	37 "	8
O - N - D "	13 "	1
J - F - M 1964	11 "	6
A - M - J "	16 "	5
J - A - S "	19 "	6
O - N - D "	70 "	12
J - F 1965	25 "	5

De dieren die gebruikt werden voor de 'curatieve' experimenten die in hoofdstuk V worden besproken, waren enkele weken ouder in verband met de tijd welke voor de - te bestralen - tumoren nodig was om tot de gewenste diameter uit te groeien.

# BEPALING VAN DE STRALINGSGEVOELIGHEID VAN DE CELLEN VAN HET RHABDOMYOSARCOOM

### Inleiding

Toen in 1962 met de voorbereidingen voor dit onderzoek werd begonnen, was in de literatuur slechts één gegeven te vinden over de stralingsgevoeligheid van cellen van solide tumoren en wel in een artikel van Hewitt (61), waarin enkele experimenten worden vermeld, die hij verichtte met een solide rondcellig sarcoom. Uit die gegevens trok Hewitt de conclusie, dat de celoverleving na bestraling van het sarcoom *in vivo* veel overeenkomst toonde met de eerder door hem op overeenkomstige wijze bepaalde waarden van een onder anoxische condities bestraalde muizeleukaemie.

In de loop van dit onderzoek kwamen nog twee publicaties ter beschikking, van resp. Powers en Tolmach (85) en Clifton en Draper (21). De eersten bepaalden met behulp van tumorceltitraties een celoverlevingscurve van een solide lymphosarcoom, in casu het 'Gardner' lymphosarcoom van de muis.

Het onderzoek van Clifton en Draper werd verricht met twee adenocarcinomen van de muis. Deze onderzoekers verkregen de celoverlevingscurven van deze tumoren uit berekeningen, waarbij als criterium voor de celviabiliteit de P.M.G. werd gebruikt na enting van verschillende hoeveelheden tumorcellen. Deze laatste werden bepaald uit de haematocriet-waarde van een tumorcelsuspensie, die was bereid met de 'cytosieve' methode volgens Snell.

Tenslotte bleek uit een voorlopig rapport van Kallman (68) dat hij celoverlevingscurven heeft gemaakt van een C<sub>2</sub>H sarcoom. Hij gebruikte een iets gemodificeerde titratiemethode, waarbij per gastheer 4 inocula\* werden gegeven.

De belangrijkste gegevens, die door genoemde auteurs verkregen werden, zijn in tabel X vermeld en zullen in de bespreking aan het eind van dit hoofdstuk worden vergeleken met de resultaten, verkregen met het rhabdomyosarcoom.

---

\*Wanneer meerdere inocula per proefdier kunnen worden gegeven betekent dit een belangrijke besparing aan proefdieren. In dit onderzoek werd echter de voorkeur gegeven aan één inoculum per proefdier, omdat bij de multipelle-inoculatietechniek het regelmatig voorkomt dat éénzelfde proefdier zowel 'negatieve inocula' herbergt als grote tumoren. Dit heeft als consequentie dat men - om het proefdier niet onnodig te doen lijden - genoodzaakt is het dier af te maken en vrij ingewikkelde correcties in rekening te brengen. Deze correcties hebben betrekking op de kans dat naderhand toch een tumor uit een 'negatief inoculum' zou zijn ontstaan.

In hoofdstuk 1 werd uiteengezet dat de stralingsgevoeligheid van cellen in sterke mate afhankelijk is van de zuurstofspanning. Daarom werden de experimenten, die werden verricht om celoverlevingscurven te verkrijgen van het rhabdomyosaroom, in drie groepen verdeeld:

1. Bestraling van de tumorcellen in anoxisch milieu (in situ en in vitro)
2. Bestraling van de tumorcellen in een milieu met voldoende zuurstof (in vitro)
3. Bestraling van de tumorcellen in hun natuurlijke milieu in het tumorweefsel (in vivo).

## Methodieken

### Bestralingsopstelling

Voor de bestralingen, die voor de uitvoering van bovengenoemd programma noodzakelijk waren, werd gebruik gemaakt van een General Electric 'Maxitron' Röntgenapparaat. De anodespanning bedroeg 250 kVp, stroomsterkte 30 mA, halveringsdikte van de straling 2,1 mm Cu\*, doseringssnelheid tussen de 40 en 200 rads per minuut. Er werd steeds gebruik gemaakt van maximale terugstrooiing, waartoe een onderlaag van omstreeks 15 cm masonite werd toegepast. De inhomogeniteit in dosisverdeling in het tumorweefsel was in deze opstelling geringer dan 5%. De toegediende Röntgendosis werd gemeten met een Baldwin 'lonex' dosimeter. Daartoe werd de ionisatiekamer van de dosimeter of naast de tumor gelegd, of op een andere representatieve positie in de Röntgenbundel.

### Berekeningsvoorbeeld

In het vorige hoofdstuk is behandeld, hoe berekening van de ED<sub>50</sub> een maatstaf oplevert voor de viabiliteit van een tumorcelsuspensie. Wanneer door de bestraling een zeker gedeelte van de tumorcellen is geïnactiveerd, zal, om hetzelfde percentage dieren met tumor te verkrijgen, een groter aantal cellen nodig zijn.

De overlevende fractie na bestraling werd berekend volgens de volgende formule:

$$\text{overlevende fractie} = \frac{\text{ED}_{50} \text{ onbestraalde tumorcellen}}{\text{ED}_{50} \text{ bestraalde tumorcellen}}$$

Figuur 17 geeft de verschuiving van de ED<sub>50</sub> waarde na bestraling weer. Het is op deze wijze mogelijk om per Röntgendosis de overlevende fractie van de tumorcellen te berekenen en aldus een celoverlevingscurve te bepalen.

\*Bepaald door J.J. Broerse.

TABEL X  
LITERATUURGEGEVENS OVER CELOVERLEVINGSCURVEN VAN SOLIDE TUMOREN  
BEPAALD MET BEHULP VAN QUANTITATIEVE TRANSPLANTATIETECHNIKEN

Auteur en Jaar	Ref.	Tumor en (Proefdier)
Hewitt en Wilson	(61)	rondcellig sarcoom
1961		(CBA)
Powers en Tolmach	(85)	C <sub>3</sub> H ED (Gardner lymphosarcoom)
1964		(C <sub>3</sub> H)
Clifton en Draper	(21)	MTG-B resp. 755 (beide mammatumoren)
1965		(C <sub>3</sub> H x C <sub>57</sub> BL)F <sub>1</sub> , resp. (DBF <sub>1</sub> )
Kallman 1965	(68)	KHT sarcoom (C <sub>3</sub> H)

## Bestraling van de tumorcellen in anoxisch milieu (in situ)

Wanneer een identieke zuurstofconcentratie vereist is voor alle cellen die zich bevinden in een dergelijk heterogeen gevasculariseerd milieu als dat van een tumor, kan deze toestand het eenvoudigst verkregen worden door middel van een - in zekere zin - 'negatieve' benadering, nl. door het onttrekken van alle zuurstof aan het milieu. Daarom werd de eerste celoverlevingscurve bepaald door bestraling van de tumorcellen in een anoxisch milieu. Dit geschiedde volgens de methode die door Hewitt (60) werd aangegeven en die gebruik maakt van het feit dat in een dood dier snel een volledige anoxie van het tumorweefsel ontstaat t.g.v. het zuurstofverbruik van de tumorcellen zelf. De proefdieren werden 10 minuten voor de bestraling met aether gedood; na de bestraling werd de tumor uitgeprepareerd en een celsuspensie gemaakt. Voor



Localisatie en Tumorgrootte	Testmethode en (ED <sub>50</sub> )	Resultaten
subcutaan  5-10 mm Ø	titratie  5 cellen	overlevende fractie overeenkomstig met die van 'anoxische' leucaemie cellen (D <sub>37</sub> 380 R)
subcutaan  1-2 cm Ø	titratie  2-5 cellen	celoverlevingscurve heeft 2 componenten met resp. D <sub>37</sub> 110 en 260 rads
subcutaan  100-400 mm <sup>2</sup>	latente periode  -	D <sub>37</sub> in vivo resp.  352 en 319 rads
subcutaan 10 mm Ø	titratie 15-140 cellen	D <sub>37</sub> in lucht en stikstof resp. 124 en 398 rads

de tumorceltitratie werden de ontvangers geïnoculeerd zoals beschreven werd in hoofdstuk III.

De resultaten zijn weergegeven in figuur 18. De onbestraalde (contrôle) ED<sub>50</sub> bedroeg 32 cellen. De curve die (op het oog) door de punten werd getrokken, levert een D<sub>37</sub> op van ongeveer 380 rads en een extrapolatiegetal N van omstreeks 10.

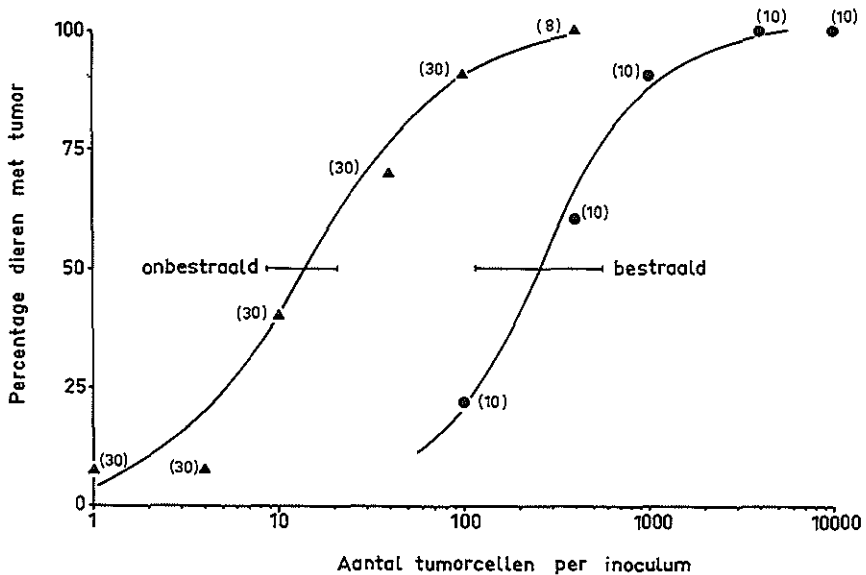
Deze D<sub>37</sub> waarde van 380 rads ligt zeer dicht bij die, welke door Hewitt en Wilson (60) bepaald werd voor een muize-leucaemie (380 R).

Het extrapolatiegetal en dus de schouder van deze overlevingscurve is waarschijnlijk wel verschillend (N=2 voor de leucaemie tegen N ongeveer 10 voor dit rhabdomyosarcoom). Het is echter duidelijk, dat tengevolge van de aanzienlijke spreiding van de resultaten geen nauwkeuriger aanwijzingen kunnen worden verkregen over de vorm van de schouder.

## Bestraling van de tumorcellen in vitro

Daar het onwaarschijnlijk geacht moet worden dat in het solide tumorweefsel een toestand bereikt kan worden, waarin alle tumorcellen voldoende zuur-

stof ter beschikking krijgen (zie hoofdstuk VI) werd besloten enkele bestralingsexperimenten te verrichten met tumorcellen in suspensie. De bedoeling was, deze tumorcellsuspensie te bestralen, nadat de zuurstofconcentratie in de suspensie volledig in evenwicht was gebracht met die van de lucht. De concentratie van de suspensie was ongeveer  $70 \times 10^6$  cellen per ml. Inleidende experimenten toonden echter aan, dat wanneer een dergelijke suspensie bestraald werd in een platte petrischaal, aanzienlijk meer cellen de bestraling



Figuur 17 VOORBEELD VAN EEN BEPALING VAN DE OVERLEVENDE FRACTIE NA BESTRALING (HET 'N<sub>2</sub>' PUNT VAN FIG. 20)

De overlevende fractie wordt berekend volgens de formule:

$$\text{overl. fr.} = \frac{\text{ED}_{50} \text{ onbestraalde tumorcellen}}{\text{ED}_{50} \text{ bestraalde tumorcellen.}}$$

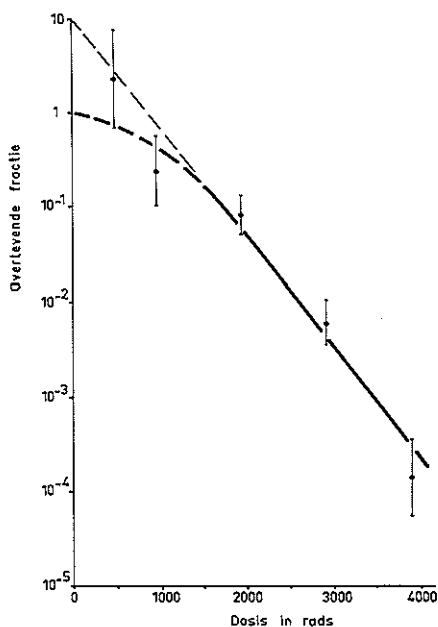
overleefden dan men zou verwachten. Dit deed vermoeden, dat toch niet alle cellen voldoende zuurstof ter beschikking kregen doordat het zuurstof verbruik van de tumorcellen onvoldoende werd gecompenseerd door de diffusie van zuurstof door de suspensie. De onderste cellen van de ongeveer 2 mm dikke laag waren dus hoogstwaarschijnlijk anoxisch.

Daarom werd in de definitieve experimenten gebruik gemaakt van een opstelling, die een intensieve gaswisseling mogelijk maakt\*. De celsuspensie bevond zich daarbij in een plastic flesje, dat onder een geringe elevatie was vastgeklemd en langzaam werd rondgedraaid om de lengte-as (fig. 19).

\*G. J. Barendsen, persoonlijke mededeling.

Tijdens het draaien bevochtigde de celsuspensie voortdurend de wanden van de fles. De lucht hierin werd doorlopend ververst (60 tot 80 ml/min) door een luchtstroom die het midden van de fles bereikte door een injectie-naald, die centraal door de stop was gestoken.

Figuur 18 OVERLEVINGSCURVE VOOR ANOXISCHE CELLEN VAN HET RHABDOMYOSARCOOM BA 1112; BESTRALING VAN DE TUMOR INSITU IN HET DODE DIER. Bij elk punt is het 95% betrouwbaarheidsgebied aangegeven door een verticale lijn. De curve werd op het oog getrokken.  $D_{37} \approx 380$  rads,  $N \approx 10$ .



Na de bestraling werden de suspensies op de gebruikelijke wijze verdund en de gewenste aantallen cellen in ontvangers geïnoculeerd.

De verkregen punten na bestraling zijn uitgezet in figuur 20; de lijn werd op het oog door de punten getrokken. De onbestraalde (contrôle) ED<sub>50</sub> bedroeg 13,5 cellen.

De  $D_{37}$  van het exponentiële gedeelte van de curve bedraagt omstreeks 120 rads. Dit betekent dat, vergeleken met de zojuist beschreven 'anoxische'  $D_{37}$  waarde van 380 rads, de zuurstofversterkingsfactor voor dit tumorsysteem ongeveer 3 is.

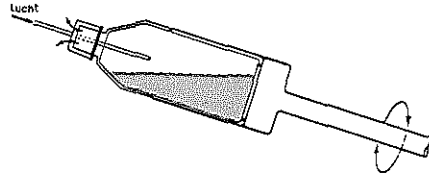
In deze serie proeven werd één experiment verricht, waarbij de lucht door stikstof was vervangen; het verkregen punt is op de figuur aangegeven als 'N<sub>2</sub>', en valt zeer fraai op de in de vorige paragrafen behandelde 'anoxische' curve.

Anderhalf jaar later werden met enkele aanvullende experimenten nog 2 punten bepaald. De controle ED<sub>50</sub> waarde hiervan bleek 52 cellen te bedragen; de overlevende fracties na doses van respectievelijk 1440 en 2880 rads werden, evenals het 'N<sub>2</sub>' punt, uitgezet in de grafiek van fig. 20. De drie

punten tonen géén significante verschillen met de celoverleving, zoals bepaald in het dode dier. Dit maakt aannemelijk, dat Hewitt's methode, om volledige anoxie van het tumorweefsel te bereiken door eerst tien minuten na de dood van het dier te bestralen, inderdaad betrouwbaar is.

Figuur 19 SCHEMA VAN DE OPSTELLING VOOR INTENSIEVE GASWISSELING VAN DE CELSUSPENSIE GEDURENDE DE BESTRALING.

De flacon draait langzaam om zijn lengte-as, zodat de celsuspensie de wanden bevochtigt. De lucht in de flacon wordt voortdurend ververst (60 ml per minuut).

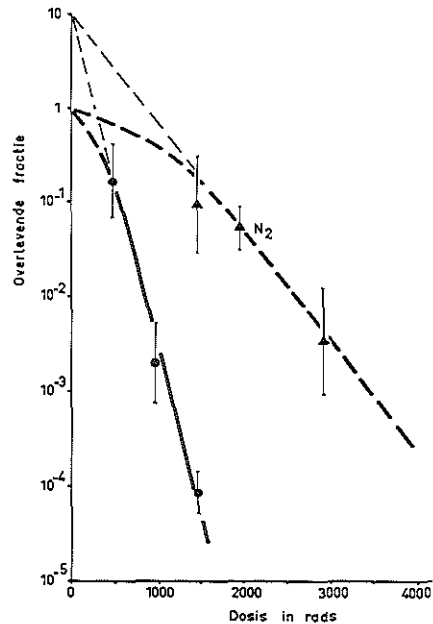


Figuur 20 OVERLEVINGS-CURVE VOOR GOED GEOXYGENEERDE CELLEN VAN HET RHABDOMYOSARCOOM BA 1112 NA BESTRALING VAN CELSUSPENSIES.

De curve werd op het oog getrokken.  $D_{37} \approx 120$  rads,  $N \approx 10$ . Bovendien is in de figuur de 'anoxische' curve van figuur 18 onderbroken aangegeven, de punten welke nabij deze curve liggen werden bepaald door bestraling onder stikstofdoorleiding.

- : de overlevende fractie na bestraling onder doorleiding van lucht.
- ▲ : de overlevende fractie na bestraling onder doorleiding van stikstof.

Bij elk punt is het 95% betrouwbaarheidsgebied aangegeven door een verticale lijn.



## Bestraling van de tumorcellen in vivo

Teneinde een indruk te verkrijgen over een mogelijk aanwezige 'anoxische' celpopulatie in de tumor in het levende dier, werd een aantal experimenten verricht, waarbij de tumor *in vivo* werd bestraald.

De tumoren, die voor deze experimenten werden gebruikt, waren steeds ge-localiseerd in het subcutane weefsel van de kop. Slechts tumoren die minder

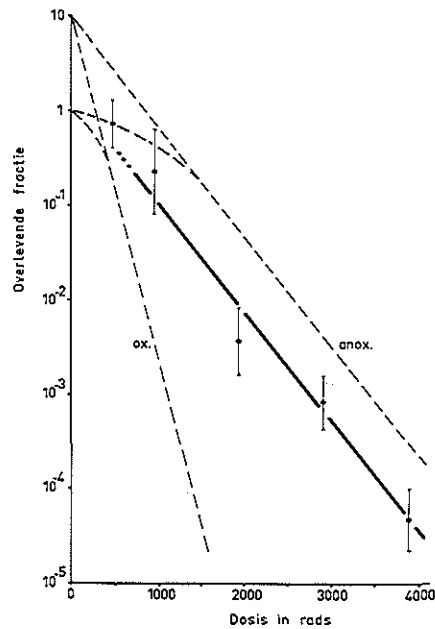
dan 1 gram wogen werden gebruikt; het gemiddelde gewicht (van de 150 tumoren) was 0,4 gram. De tumor die is afgebeeld in figuur 16 is representatief voor zowel de localisatie als voor het gewicht. Er werd nauwlettend voor gezorgd, dat de bloedvoorziening van de tumoren tijdens de bestraling ongestoord was.

De dieren werden daarom niet genarcofiseerd, maar op hun plaats gehouden door fixatie van de poten met plakband, of door hen te bestralen in een goed geventileerde platte perspex kooi. Het bestralingsveld werd doorgaans beperkt tot het craniale deel van het lichaam. De dieren konden de kop vrijelijk bewegen binnen een beperkt gebied, waarbinnen de afwijking van de gemeten Röntgendosis niet groter dan 5% was. Na de bestraling werd op de gebruikelijke wijze een celsuspensie van de tumoren gemaakt die in de gewenste verdunning werd geïnoculeerd.

Figuur 21 OVERLEVINGSCURVE VAN CELLEN VAN HET RHABDOMYOSARCOOM NA BESTRALING IN VIVO.

Het gemiddelde gewicht van de bestraalde tumoren was 0,4 gram. Bij elk punt is het 95% betrouwbaarheidsgebied aangegeven door een verticale lijn.

Uit de ligging van de punten ten opzichte van de (onderbroken) 'anoxische' en 'goed geoxygeneerde' curven (figuur 18 en 20) kon worden afgeleid dat ongeveer 15% van de tumorcellen anoxisch is.



De onbestraalde (contrôle) ED<sub>50</sub> voor deze groep experimenten was 30 cellen: de verkregen punten zijn uitgezet in figuur 21. Het is duidelijk, dat de punten zich dicht bij de 'anoxische' curve bevinden. Deze waarneming kan het best verklaard worden door aan te nemen dat de tumoren een zekere hoeveelheid 'anoxische' cellen bevatten. Het gehalte aan anoxische cellen werd voor ieder punt (dus bij de verschillende Röntgendoseringen) berekend volgens de formule:

$$\% \text{ anoxische cellen} = 100 \frac{\text{overl. fr. (vivo)} - \text{overl. fr. (vitro ox.)}}{\text{overl. fr. (anox)} - \text{overl. fr. (vitro ox.)}}$$

Wegens de eerder genoemde onzekerheden omtrent het juiste verloop van de vorm van de schouder van de - in de vorige paragrafen behandelde - overlevingscurven, werd het gewogen gemiddelde bepaald voor de drie punten die zich ter hoogte van het rechte gedeelte van de curve bevinden. Dit betreft dus de *in vivo* waarden voor de doses van 1920, 2880 en 3840 rads. Voor de bepaling van het 'gewicht' per punt werd de N waarde van de berekeningsmethode van Litchfield en Wilcoxon gebruikt. De definitie hiervan is 'het totale aantal dieren dat gebruikt werd tussen de 16 en 84 procent verwacht effect', dus binnen de standaardafwijking van de ED<sub>50</sub>. Het op deze wijze verkregen gewogen gemiddelde van het gehalte 'anoxische' cellen bedraagt 15%.

De overlevingscurve die door de punten van figuur 21 is getrokken, werd berekend overeenkomstig de grafiek van Hewitt (56), waarbij in dit geval werd aangenomen dat 15% van de cellen volledig anoxisch waren.

Uit deze *in vivo* overlevingscurve blijkt duidelijk, dat de overlevende fractie van de cellen van deze kleine tumoren bij doses, hoger dan ongeveer 1000 rads, grotendeels wordt bepaald door de aanwezigheid van - slechts- 15% anoxische cellen.

## Bespreking van de resultaten

Dit rhabdomyosaroom is volgens klinische maatstaven (zie hoofdstuk III) waarschijnlijk als stralingsresistent te beschouwen. Het was daarom enigszins verrassend dat de D<sub>37</sub> van de celoverlevingscurve van de anoxische cellen van deze tumor vrijwel gelijk bleek te zijn aan de waarde die door Hewitt en Wilson (60) werd gevonden voor een muize-leucaemie (lymphosaroom). Aangezien lymphosarcomen klinisch gewoonlijk als zeer stralingsgevoelig wordt beschouwd, rijst de vraag of het verschil tussen de zogenaamde stralingsgevoelige en resistente tumoren wel berust op verschillen in D<sub>37</sub> waarden van desbetreffende celoverlevingscurven.

Inderdaad blijkt, dat wanneer de D<sub>37</sub> waarden van dit rhabdomyosaroom worden vergeleken met de getallen van tabel X, de onderlinge verschillen niet groot zijn. Ook wanneer men de D<sub>37</sub> waarden van tabel I (hoofdstuk I), verkregen met zeer uiteenlopende systemen beziet, kan men zich niet aan de indruk onttrekken dat de vorm van de meeste celoverlevingscurven meer gekenmerkt is door overeenkomst dan door opvallende verschillen.

Men dient echter niet uit het oog te verliezen dat, ook al moge er in algemene zin overeenkomst zijn in de vorm van de celoverlevingscurven van verschillende celtypen, voor de resultaten van de radiotherapie ook kleine verschillen van groot belang kunnen zijn.

Deze verschillen kunnen bijvoorbeeld bestaan in de vorm van de schouder van de celoverlevingscurven en het gehalte anoxische cellen in verschillende weefsels.

Over de consequenties van de vorm van de schouder van de celoverlevingscurve op de klinische stralingsgevoeligheid wordt in hoofdstuk VII nader ingegaan. Het zij voldoende hier op te merken dat de mate van herstel van stralingsschade van cellen in de periode tussen twee fracties bij gefractioneerde

radiotherapie, bepalend is voor de vorm van de schouder; hoe groter het intracellulaire herstel, hoe groter de schouder.

Het is dus waarschijnlijk, dat - naast anoxie - niet zozeer de  $D_{37}$  van de celoverlevingscurve, als wel de vorm van de schouder een maat is voor de stralingsresistentie van een tumor onder gefractioneerde bestraling.

Het vrij hoge extrapolatiegetal N van ongeveer 10 van dit rhabdomyosarcoom kan in deze richting wijzen en dat is dan in overeenstemming met de eerder genoemde minimale resultaten, die werden verkregen toen deze tumor aan gefractioneerde bestraling werd onderworpen.

Een tweede belangrijk punt ter bespreking betreft de resultaten, welke zijn af te leiden uit de in vivo curve. In verband met de veronderstelling, dat van grotere tumoren de kans op een inferieure bloedvoorziening groter is, werden slechts tumoren gebruikt met een gewicht van minder dan één gram. Toch blijkt uit de resultaten, dat ongeveer 15% van de cellen in deze kleine tumoren (gemiddeld 0,4 gram) als volledig anoxisch beschouwd moeten worden. Deze voorstelling van zaken is sterk gesimplificeerd, daar men moet aannemen, dat er in feite een geleidelijk afnemende zuurstofspanningsgradient vanuit de capillairen in het weefsel bestaat. Beter kan men dus spreken over een sterk verlaagde zuurstofontspanning in het milieu van meer dan 15% van de cellen. Op de verschillende aspecten van de zuurstofvoorziening in tumoren wordt in hoofdstuk VI nader ingegaan.

Omtrent het gehalte anoxische cellen in solide tumoren zijn in de literatuur nog niet veel gegevens gepubliceerd. Slechts de schattingen van Hewitt en Powers en Tolmach zijn voor vergelijking ter beschikking, alsmede mededelingen die kortgeleden werden gedaan door van Putten en Kallman (89) en Clifton c.s. (20).

De conclusie van Hewitt was, dat het door hem bestudeerde sarcoom grotendeels uit anoxische cellen bestaat, terwijl de resultaten van Powers en Tolmach doen vermoeden dat het door hen gebruikte solide lymphosarcoom ongeveer 1% anoxische cellen bevat. Zoals werd vermeld, is het gehalte aan anoxische cellen van het in dit onderzoek bestudeerde rhabdomyosarcoom ongeveer 15%. Van Putten en Kallman vonden eveneens 15% anoxische cellen in het door hen bestudeerde C<sub>3</sub>H sarcoom.

Berekeningen van Clifton c.s. wezen uit dat ongeveer 20% anoxische cellen in de door hen onderzochte solide transplantabele muize-carcinomen aanwezig zijn.

Er zijn nu dus enige waarden bekend over de percentages anoxische cellen die - met behulp van kwantitatieve transplantatietechnieken - in solide tumoren werden gevonden. Deze waarden (resp. ongeveer 100%, 20%, 15% en 1% anoxische cellen), tonen onderling nogal grote verschillen maar dit doet niets af aan het feit dat alle onderzochte tumoren een meetbaar gehalte aan anoxische cellen bevatten. De genezingskans van de tumoren na éénmalige bestraling zal daardoor grotendeels worden bepaald.

In het volgende hoofdstuk wordt nader ingegaan op de genezingskans van het rhabdomyosarcoom na bestraling.

\* \* \* \* \*

# DE GENEZINGSKANS VAN HET RHABDOMYOSARCOOM NA BESTRALING

## Inleiding

In het vorige hoofdstuk werd voor het rhabdomyosarcoom de relatie besproken die werd gevonden tussen de Röntgendosis en de fractie overlevende cellen, waarbij gebruik werd gemaakt van een techniek van kwantitatieve transplantatie.

In de theoretische radiobiologische literatuur wordt meestal zonder meer een model van een celoverlevingscurve geëxtrapoleerd naar een overlevende fractie van b.v.  $10^{-11}$  om hiermede de Röntgendosis te schatten welke minder dan één cel in een bepaalde tumor in leven zou laten. Een 90% genezingskans zou eerst dan bereikt worden wanneer gemiddeld per tumor  $10^{-1}$  cel zou overleven, aangenomen dat één intacte cel tot een tumor kan uitgroeien (118).

Verificatie van deze zuiver theoretische extrapolatie leek echter gewenst, vooral omdat bij het experimentele onderzoek van langdurige fractioneringsregimes, kwantitatieve transplantatie hiervoor niet bruikbaar zal zijn. Het is nl. niet te verwachten dat uit een tumor die t.g.v. gefractioneerde bestraling in regressie is, nog op kwantitatieve schaal tumorcellen voor transplantatie te isoleren zijn. Daarbij zou de interpretatie van de resultaten op grote moeilijkheden stuiten wegens gebrek aan informatie over het aantal afgevoerde cellen. Men is daarom dus aangewezen op een andere methode van kwantitatief onderzoek en wel op die van de 'curatieve' bestraling, waarbij het natuurlijk noodzakelijk is dat de resultaten, verkregen met beide systemen na enkelvoudige bestraling eerst met elkaar vergeleken zijn. Deze vergelijking zal het onderwerp vormen van dit hoofdstuk, waarin de term 'curatieve' bestraling of 'curatieve' dosis gebruikt zal worden in verband met experimenten, die de bepaling van de genezingskans van een tumor na lokale Röntgenbestraling tot doel hebben.

Een aantal van de factoren welke de genezingskans van een tumor na éénmalige bestraling zullen kunnen beïnvloeden zijn in de vorige hoofdstukken reeds ter sprake gekomen; dit zijn o.a. de stralingsgevoeligheid van de tumorcellen, de zuurstofvoorziening van het tumorweefsel en het aantal tumorcellen dat aanwezig is in de tumor.

Hoewel veel onderzoek is verricht over de reactie van experimentele tumoren op bestraling is het toch opvallend dat dit maar weinig werkelijk betrouwbare resultaten heeft opgeleverd. Gedeeltelijk is dit te wijten aan het



feit dat zelfs tot op heden nog wordt geëxperimenteerd met tumoren die afwijkende antigenen bezitten t.o.v. de gastheer. Bovendien zijn bij veel van de onderzoeken onbevredigende criteria gebruikt zoals tumor 'regressie', waarmee de vermindering van het volume van een tumor na bestraling wordt bedoeld.

Het al dan niet snel slinken van de tumormassa na bestraling is grotendeels afhankelijk van de processen die de afvoer van dood celmateriaal beheersen en wordt nauwelijks beïnvloed door een (gering) aantal in het tumorweefsel overlevende cellen. Suit, Lindberg en Fletcher (103) vonden dan ook géén correlatie tussen de snelheid van tumorregressie en de genezing van tumoren in hun studies met het C<sub>3</sub>H adenocarcinoom van de muis en met menselijke tumoren.

De literatuurgegevens die samengevat zijn in Tabel XI hebben daarom alleen betrekking op diè publicaties waarin de 'genezing' van de tumor als criterium werd gebruikt.

De betrouwbaarste maatstaf om de reactie van een tumor in een curatieve opstelling te waarden wordt verkregen door bepaling van de Röntgendosis waarbij de helft van de bestraalde tumoren geneest. De meest gebruikte term hiervoor is de TCD<sub>50</sub> of '50% Tumor Cure Dose'. De uitdrukking TCD<sub>50</sub>\* wordt in dit hoofdstuk gebruikt als betrouwbaarste maat voor het effect van curatieve bestraling.

De hoogste waarden, welke in de tabel staan vermeld, zijn die van Goldfeder (43). De reden waarom bij de tumoren met een dosis van 10.000 R slechts regressie van 80, respectievelijk 74% van de tumoren bereikt werd, is uit het artikel niet geheel duidelijk. Mogelijk zijn de bestralingsopstelling en/of de dosimetrie niet perfect geweest. Een dosis van 2 x 5000 R zou naar onze ervaring een aanzienlijk grotere schade aan de bestraalde huid moeten geven dan uit een foto in het artikel blijkt. De laagste TCD<sub>50</sub> waarden uit de tabel zijn gepubliceerd door Kallman (69). Opmerkelijk is dat één van de door hem bestudeerde tumoren gedurende vele jaren getransplanteerd is. Men zou op grond hiervan kunnen vermoeden dat antigene verschillen debet zijn aan deze lage TCD<sub>50</sub>.

De overige TCD<sub>50</sub> waarden bevinden zich tussen de 4230 en 6200 rads en zowel Cohen en Cohen als Suit en Shalek proberen de TCD<sub>50</sub> te correleren met het aantal overlevende cellen in de tumor.

Uit de gegevens van Cohen blijkt duidelijk dat ook deze tumor afwijkende antigenen bezit. Door de proefdieren te immuniseren wordt de TCD<sub>50</sub> lager; door de immunologische afweer van de proefdieren te verzwakken wordt de TCD<sub>50</sub> hoger. De D<sub>37</sub> van de tumorcellen werd door hem geschat door de TCD<sub>50</sub> van tumorfragmenten na bestraling in vitro en van tumoren in vivo te bepalen.

---

\*Sommige auteurs gebruiken de uitdrukking 'TD<sub>50</sub>' (of 50% tumor cel dosis) in plaats van ED<sub>50</sub> voor de waardering van de viabiliteit van de tumorcellen bij celtitraties. Dit kan echter vrij verwarrend zijn en men kan beter de uitdrukking ED<sub>50</sub> en TCD<sub>50</sub> naast elkaar gebruiken voor de waardering van respectievelijk tumorceltitratie en tumorgenezing en de term TD<sub>50</sub> vermijden.

Het verschil dat hij vond bedroeg 2400 rads en hij berekende daarmee op grond van het verschil in volume tussen de tumorfragmenten en de *in vivo* tumoren een  $D_{37}$  van 390 rads. Tevens schatte hij dat in deze tumoren na bestraling

TABEL XI

LITERATUURGEGEVENS BETREFFENDE EXPERIMENTELE CURATIEVE BESTRALING

<u>Auteur en Jaar</u>	Ref.	Tumor en (Proefdier)	Gebruikte doses*
<u>Suit c.s.</u> 1960	(106)	Adeno Ca (C <sub>3</sub> H)	5500 R 5500 R
<u>A. Cohen en L. Cohen</u> 1960	(22)	Adeno Ca (C <sub>3</sub> H)	4200 - 7500 rads
<u>Goldfeder</u> 1962	(43)	D B A H (DBA)	10.000 R
"	"	D B A G (DBA)	10.000 R
<u>Suit en Shalek</u> 1963	(105)	Adeno Ca (C <sub>3</sub> H)	465 - 5650 rads
"	(106)	Adeno Ca**** (C <sub>3</sub> H)	3300 - 9400 rads
<u>Kallman</u> 1964	(69)	S M T**** (C <sub>3</sub> H) S M T (C <sub>3</sub> H) H 134***** (C <sub>3</sub> H)	onbekend " "

\* De gebruikte stralingskwaliteiten ontlopen elkaar niet veel en variëren tussen de 140 kV en 250 kV Röntgenstraling.

\*\* De door de auteurs opgegeven tumorgrootte is hier vermeld; bij sommigen was dat de diameter, bij anderen het volume van de tumor.

dan 25 cellen overbleven. Dit door hem genoemde 'critical cell number' is identiek aan de in dit proefschrift gebruikte term 'E D<sub>50</sub>'. In het door hem bestudeerde tumor-gastheersysteem blijkt het 'critical cell number' afhankelijk

Tumor grootte**	T C D <sub>50</sub> ***	Criteria en opmerkingen
7 - 10 mm Ø		85% "cure"
1 - 15 mm Ø		42% "cure"
		"cure" = 90 dagen na bestraling nog vrij van tumor
0 mm Ø	5560 R	Indien D <sub>37</sub> op ongeveer 390 rads wordt geschat (% anoxische cellen is onbekend) dan bedraagt het "critical cell number" 25 cellen.
12 - 15 mm Ø		80%
"		74%
		complete + waarschijnlijke regressie (langer dan 6 maanden na bestraling.)
6 mm <sup>3</sup>	4975 rads	indien
		1 cel overleeft (en n=2) dan is de D <sub>37</sub> 306 rads
		10 cellen overleven " " " " " 356 rads
		100 cellen overleven " " " " " 426 rads
00 mm <sup>3</sup>	6200 rads	indien
		1 cel overleeft " " " " " 300 rads
40 mm <sup>3</sup>	4230 rads	spontane mammatumoren
"	2730 rads	4e en 5e passage van mammatumoren
"	2900 rads	lang doorgetransplanteerd isoloog hepatoom
		"cure" indien langer dan 100 dagen na bestraling tumorvrij

\*\*\* T C D<sub>50</sub> of 50% Tumor Genezings Dosis.

\*\*\*\* Spontane tumoren; alle andere in de tabel vermelde tumoren waren getransplanteerd.

\*\*\*\*\* Hepatoom; alle andere in de tabel vermelde tumoren betreffen mammatumoren.

te zijn van de immuunreactiviteit van de gastheer.

De systemen van Suit en Shalek zijn mogelijk wel vrij van storende immunologische factoren. Zij deden experimenten met spontane  $C_3H$  adenocarcinomen en met isologe transplantaten (de eerste passage) van deze tumoren in het oor. De TCD<sub>50</sub> van de 4,6 mm<sup>3</sup> grote transplantaten was 4975 rads. Uit een dergelijk curatief experiment kan uiteraard niet zonder meer een D<sub>37</sub> afgeleid worden, omdat het minimum aantal cellen dat nog tot een recidief aanleiding kan geven onbekend is. In tabel XI zijn daarom de door hen veronderstelde aantallen overlevende cellen weergegeven, evenals de daaruit volgende D<sub>37</sub> waarden. Er is een goede overeenkomst tussen de D<sub>37</sub> waarde van omstreeks 306 rads voor de getransplanteerde tumor en de D<sub>37</sub> van 300 rads voor de spontane adenocarcinomen, indien in beide gevallen wordt aangenomen dat één cel overleeft bij de TCD<sub>50</sub>.

Uit het voorgaande is duidelijk gebleken dat, wil men zich een oordeel vormen over de celoverleving na bestraling van een solide tumor, die in situ blijft, niet alleen de 'Tumor Genezings Dosis' bepaald dient te worden, maar ook het minimum aantal tumorcellen, dat tot een recidief aanleiding kan geven.

Zoals in de vorige hoofdstukken werd beschreven kan voor het door ons bestudeerde rhabdomyosarcoom door middel van tumorceltitraties nauwkeurig de relatie bepaald worden tussen het aantal geïnoculeerde tumorcellen en het percentage dieren met tumor dat hieruit resulteert.

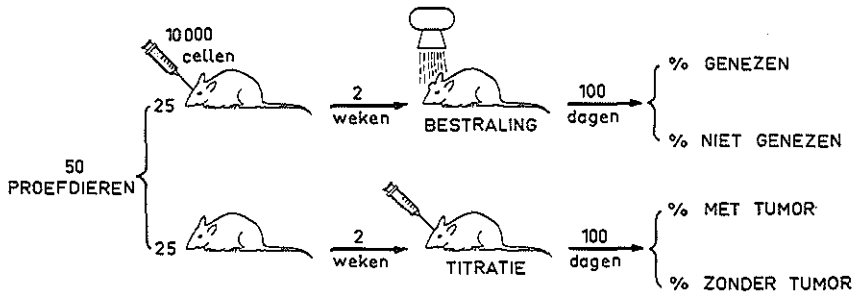
Uitgaande van de gedachte dat er een verband bestaat tussen de uitkomsten van de tumorceltitraties en het aantal overlevende cellen dat in bestraalde tumoren aanleiding kan geven tot een recidief, werd ter bepaling van dit 'critische aantal cellen', naast de serie experimenten betreffende de curatieve bestraling, een gelijk aantal tumorceltitraties verricht.

## Methodieken

Teneinde storende factoren, in het bijzonder eventuele periodieke variabiliteit, zoveel mogelijk uit te sluiten, werden de proeven zo geregeld, dat op de dag van de bestraling van een groep proefdieren met tumor, een even oude groep dieren werd getitreerd met een onbestraalde (contrôle) tumorcelsuspensie. Deze suspensie werd tevens gebruikt om een nieuwe groep proefdieren te inoculeren, opdat de tumoren die zich hieruit ontwikkelden omstreeks twee weken later bestraald konden worden. Een schema van de proefopstelling wordt weergegeven in figuur 22.

De - te bestralen - proefdieren werden geïnoculeerd met een suspensie van 10.000 cellen in 0,05 ml Simms' oplossing. De plaats van inoculatie was, zoals gebruikelijk, het subcutane bindweefsel van de kop tussen de oren. Er werd naar gestreefd om de verspreiding van de tumorcellen in het subcutane weefsel te beperken, opdat circumscripte tumoren zouden ontstaan. Daartoe werd het te injecteren volume zo gering mogelijk gehouden: 0,05 ml werd gebruikt als compromis tussen het minimale volume, dat reproduceerbaar geïnjecteerd

kan worden en de hanteerbaarheid wat betreft de injectie van grote aantallen dieren in korte tijd.

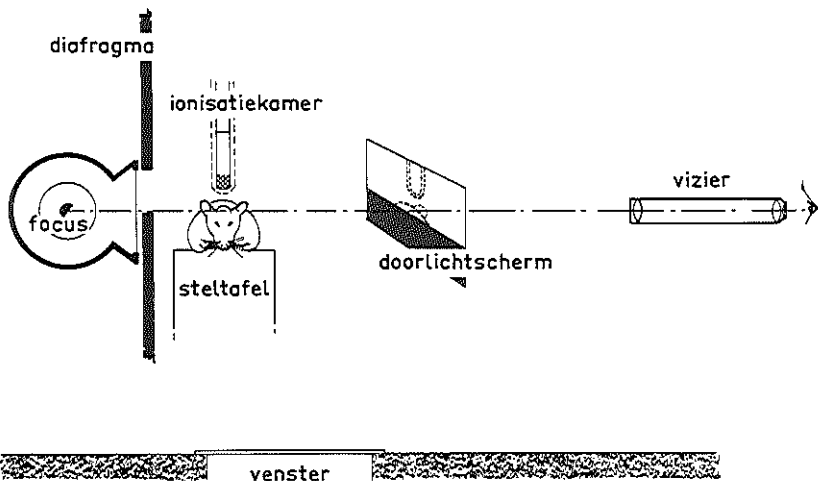


Figuur 22 SCHEMA VAN DE PROEFOPSTELLING VOOR EEN PARALLEL-EXPERIMENT VOOR CURATIEVE BESTRALING VAN RHABDOMYOSARCOOM BA 1112 EN CELTITRATIE. Deze procedure werd voor alle 13 experimenten toegepast in een continue reeks, zodat dezelfde celsuspensie kon dienen voor zowel de inoculatie van de te bestralen dieren als voor de tumor celtitratie van een vorige groep.

Vooraf in de eerste experimenten bleken de tumoren toch een enkele maal een strengvorm te hebben, of een klein uitlooptje naar achteren te vertonen. Om deze multifocale localisatie zoveel mogelijk tegen te gaan werd naderhand een hulsje om de naald aangebracht, zodat deze niet verder dan 1 à 2 mm in de subcutis kon doordringen.

De bestralingsopstelling is eenvoudig en is weergegeven in figuur 23. Het proefdier ligt in een lichte pentothal anesthesie op een stelfafel. Hierdoor is het mogelijk een nauwkeurig begrensde tangentiële bestraling van tumor en schedeldak in te stellen. Als hulpmiddel voor het instellen wordt gebruik gemaakt van een vizier, waarvan het gemarkeerde centrum nauwkeurig is gericht op het focus van de Röntgenbuis. De onderzijde van de Röntgenbundel is afgedekt met lood, zodat slechts datgene, dat boven de centraalstraal ('horizon') uitsteekt bestraald wordt. De uitbreiding van de Röntgenbundel naar de nekzijde van het dier wordt tevens door een verticaal deel van het diaphragma beperkt; dit is echter niet op de figuur aangegeven. Wanneer de hoogte van de stelfafel zo is ingesteld, dat slechts de tumor en een gedeelte van het schedeldak bestraald zullen worden, wordt een doorlichtscherm in de bundel geschoven, zodat de juiste positie van het proefdier gedurende de gehele bestraling gecontroleerd kan worden. De ionisatiekamer van de 'Baldwin' Ionex dosimeter bevindt zich boven de tumor en ontvangt dezelfde dosis als de tumor. De stralingskwaliteit is 300 kVp Röntgen, 10 mA (Philips-Müller industrieel apparaat, type MG 300), het filter bestond in de eerste experimenten uit 1

mm Cu (HVD 2,7 mm Cu). Naderhand werd dit ter verhoging van de doserings-snelheid gewijzigd in 0,6 mm Cu + 1 mm Al (HVD 2,0 mm Cu).\*



Figuur 23 OPSTELLING VOOR CURATIEVE BESTRALING.

Slechts datgene, wat boven de centraalstraal uitkomt wordt bestraald. De instelling gebeurt met een vizier, continue controle gedurende de bestraling is mogelijk door middel van een doorlichtingsscherm. De dosis wordt gemeten met behulp van een ionisatiekamer vlak boven de tumor.

De dosisverdeling in de tumoren werd nagegaan door middel van een phantom opstelling, bestaande uit zowel aan de voor- als aan de achterzijde van de ionisatiekamer bevestigde plaatjes masonite van een dikte, overeenkomende met de te bestralen tumoren. De afwijking van de homogeniteit in dosisverdeling bleek geringer dan 5%. De focus-huidafstand was 18 cm, de doseringssnelheid in de beschreven opstelling bedroeg tussen de 384 en 627 rads/minuut. De gebruikte doses varieerden van 1920 rads tot 6720 rads. Ondanks de hoge stralingsdoses welke in deze opstelling werden gegeven, was het door de hoge doseringssnelheid toch mogelijk om de duur van de bestralingen in dezelfde orde van grootte te houden als van de in het vorige hoofdstuk beschreven experimenten.

In de beschreven bestralingsopstelling is het onvermijdelijk, dat de oorschelpen van het proefdier worden meebestraald. Dit houdt in dat na een Röntgendosis van 3000 rads en hoger de oorschelpen tengevolge van bestralingschade sterk vervormd worden. Derhalve werden de proefdieren voor de individuele registratie niet door een oormerk, maar door een subcutaan in de poten geïnjecteerde quaddel Oostindische inkt gemerkt.

\*De halveringsdikte werd bepaald door J.J. Broerse en M.A.J. Stuart.

De diameter van elke bestraalde tumor werd gemeten en geregistreerd op de dag van bestraling.

De meeste auteurs, die in tabel XI worden genoemd, gebruikten voor hun bestralingsopstelling een kokervormige loodafscherming om de muizen, met daarin een gat, waardoor de tumor naar buiten kon worden gebracht. Deze laatste werd doorgaans gefixeerd met plakband; soms werd aan de tumor nog getrokken door middel van een forceps. Het is duidelijk, dat een goede bloedvoorziening van de tumor in een dergelijke opstelling moeilijk te garanderen is. Een belangrijk voordeel van onze bestralingsopstelling is, dat de bloedvoorziening van de tumor volledig onbelemmerd is en dat gedurende de bestraling de juiste instelling fluoroscopisch gecontroleerd kan worden.

Het is een nadeel van vrijwel elke opstelling voor locale bestraling, dat een lichte narcose van het proefdier onvermijdelijk is. Pentothal (5 mg/100 gram lichaamsgewicht) voldeed hiertoe het beste en wordt ook door de meeste auteurs, die in tabel XI worden genoemd, gebruikt.

De invloed van de narcose op b.v. de oxygenatie van het tumorweefsel kan niet onderzocht worden door het ontbreken van betrouwbare meetmethoden. Tumorceltitraties in combinatie met bestraling (hoofdstuk IV) zijn voor het aantonen van een geringe variatie van de zuurstofconcentratie te onnauwkeurig en polarografische zuurstofmeting\* is niet goed uitvoerbaar in tumorweefsel van ongenarcofiseerde dieren. Een mogelijk nadeel zou kunnen zijn dat door de narcose gedurende de bestraling de bloeddruk enigszins daalt, hetgeen de oxygenatie van het tumorweefsel zou kunnen beïnvloeden. De zuurstofconsumptie van de proefdieren is daarentegen geringer door het ontbreken van de normale activiteit en de roze huidskleur tijdens de narcose wijst op een voldoende mate van oxygenatie van het circulerende bloed.

Er werden in totaal 13 experimenten verricht. Tabel XII geeft een overzicht van het aantal dieren, dat niet bestraald is wegens afwezigheid van een aantoonbare tumor, en het aantal dat overleden is tengevolge van de narcose of andere complicaties. Een gering aantal van de dieren overleed na de bestraling, mogelijk tengevolge van afkoeling gedurende de narcose.

Opmerkelijk is, dat ondanks de zorgvuldige instelling van de proefdieren voor de bestraling, toch een aantal dieren een recidief buiten het bestralingsveld toonden. Deze 'missers' zijn geheel homogeen over het materiaal verspreid en het is onwaarschijnlijk dat zij invloed kunnen hebben op de uiteindelijke resultaten. De meeste 'missers' werden ontdekt bij de wekelijkse inspectie van de bestraalde dieren. Meestal bevond zich dan een tumorknobbel achter de oren en duidelijk buiten het bestralingsveld. De uitbreiding van dit laatste is herkenbaar aan de epilatie van de bestraalde huid. Bij enige twijfel werd het dier als 'niet genezen' geadministreerd.

Nadat de 'follow up'-periode van 100 dagen na de bestraling van het laatste experiment was verstreken, werden de getallen van de aantallen gene-

---

\*Voor een bespreking hiervan zie hoofdstuk VI.

zen en niet-genezen dieren en de resultaten van de tumorceltitraties verzameld en hiervan werden probitanalyses gemaakt.\*

TABEL XII  
OVERZICHT VAN HET AANTAL PROEFDIEREN, GEBRUIKT  
VOOR DE CURATIEVE BESTRALINGSEXPERIMENTEN

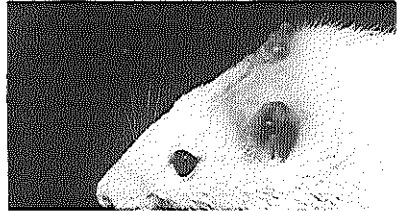
Genezen	114
Niet-genezen	249
Niet bestraald wegens afwezigheid van tumor op dag van bestraling	28
Overleden t.g.v. narcose en/of complicaties + dieren welke bewogen hebben tijdens de bestraling	53
Dieren met tumor buiten bestralingsveld ('missers')	25
Overleden zonder voldoende informatie binnen 100 dagen na bestraling	6

475

## Resultaten

Wanneer een proefdier 100 dagen na bestraling vrij van tumor was, werd het dier als genezen beschouwd (fig. 24). Het verloop van de symptomen na bestraling was als volgt. De eerste weken na de bestraling met doses boven de

Figuur 24 FOTO VAN EEN RAT WAARVAN DE TUMOR DOOR EEN CURATIEVE BESTRALING IS GE-NEZEN.  
Het bestraalde gebied is duidelijk herkenbaar aan de epilatie.



3500 rads ontstaat epilatie en desquamatie van de bestraalde huid, tevens wordt de tumormassa geheel geresorbeerd. Na omstreeks één à twee maanden is de huid genezen, zij het dat er een permanente epilatie is ontstaan. Een tumorrecidief kondigt zich het eerst aan doordat er midden in het geëpileerde gebied een minuscule subcutaan knobbelletje ontstaat. Dit groeit in de daarop volgende dagen langzaam uit en de huid ter plaatse gaat ulcereren: er ontstaat een tumor-ulcus. In enkele twijfelgevallen werd dit tumor-ulcus histologisch onderzocht en steeds werd bij histologisch onderzoek tumorweefsel aangetoond. Meestal werd echter het dier verder geobserveerd en het feit, dat een tumorrecidief was ontstaan, werd dan duidelijk uit de voortdurende progressie van het ulcus. Wanneer de uitbreiding van het tumor-ulcus, met zijn opgeworpen randen de grens van het bestraalde gebied overschreed, was een snelle

\*Afdeling Bewerking Waarnemings uitkomsten. - T.N.O.  
Dr. E.F. Drion en Th.J. van Goudzwaard.



tumorgroei in de onbestraalde subcutis het gevolg. Het verschil in aspect tussen genezen en niet-genezen dieren is gewoonlijk zo duidelijk dat hierover geen twijfel mogelijk is.

TABEL XIII  
 RESULTATEN VAN DE CURATIEVE BESTRALING VAN TUMOREN VAN  
 4 t/m 15 MM DIAMETER  
 (in de kolommen; aantal genezen/totaal)

Tumordiameter op tijdstip van bestraling.	DOSIS IN RADS										
	6720	6240	5760	5280	4800	4320	3840	3360	2880	2400	1920
4		5/5	7/9	6/7	1/10	1/3	1/3	0/1	1/5	0/3	
5	1/1	3/3	5/8	2/2	1/9	0/2	1/3	0/3	0/6		0/3
6	2/2	7/7	2/3	0/3	1/4	0/1	0/3	0/1	0/2	0/6	0/2
7	5/5		3/5	3/7	1/6	0/5	0/3	0/4	0/1	0/2	0/6
8	4/4		5/6	2/5	1/5	0/3	0/3	0/6	0/7	0/2	0/3
9	5/7	0/1	5/7	2/5	0/9	0/6	0/9	0/7	0/4	0/1	0/1
10	3/3	3/3	0/1	0/1	0/3	0/1	0/7				0/1
11	2/2	0/1	0/3	1/1	1/2	0/2		0/1	0/1		
12		0/1	0/1		0/1	0/2		0/2	0/2		
13	1/1		0/2		0/1						
14			0/1								
15						0/1				0/1	
	23/25	18/21	27/46	16/31	6/50	1/26	2/31	0/25	1/28	0/15	0/16
genezen tumoren	92%	86%	59%	52%	12%	4%	6%	0%	4%	0%	0%

De resultaten van 13 experimenten worden weergegeven in tabel XIII. De diameter van de bestraalde tumoren varieerde van 4 tot 15 mm. Een aantal tumoren was ten tijde van de bestraling nog net met de vinger te voelen alsof het een subcutaan strengetje of zandkorrel betrof. Deze zijn apart vermeld in tabel XIV als zandkorrel-grote tumoren. De regressielijn van de probit-berekeningen van tabel XIII wordt weergegeven in figuur 25, die van de zandkorrel - grote tumoren in figuur 26. De T C D 50 van de eerste groep is 5460 rads, van de tweede 5208 rads. Dit verschil is niet significant.

De probit-regressielijn van de tumorceltitraties wordt weergegeven in figuur 27. De ED<sub>50</sub> is 51 cellen, dus een inoculum van 51 cellen zal in 50% van de proefdieren een tumor ter plaatse van het inoculum doen ontstaan binnen een termijn van 100 dagen.

De overlevende fractie van de tumorcellen na 'curatieve' bestraling, b.v. na de TCD<sub>50</sub>, kan berekend worden volgens de volgende formule:

$$\text{overlevende fractie} = \frac{\text{Gem. aant. cellen, nodig voor 50\% 'dieren met tumor'}}{\text{Gem. aant. cellen, aanw. in de bestraalde tumoren}} \quad (\text{TCD}_{50})$$

Van deze breuk is de teller gelijk aan de ED<sub>50</sub>, de noemer is als volgt te berekenen: De gemiddelde diameter van de bestraalde tumoren was 6,9 mm. Deze gemiddelde diameter werd berekend voor de groep van tumoren met het genezingspercentage tussen de 10% en 90%. Dit komt overeen met de Röntgendoses

van 4320 toten met 6720 rads. De relatie tussen de gemeten tumordiameter en het gewicht is bekend (figuur 6, hoofdstuk II), en zoals in hoofdstuk III werd

TABEL XIV  
 RESULTATEN VAN DE CURATIEVE BESTRALING VAN  
 ZANDKORREL-GROTE TUMOREN

Dosis in rads	Aantal genezen totaal
6240	5/6
5760	8/11
5280	2/6
4800	1/6
4320	2/6
3840	1/4
3360	1/5
2880	0/3
2400	0/1
1920	0/1

vermeld, wordt het aantal cellen in het tumorweefsel geschat op  $5 \times 10^8$  cellen per gram. Een tumor van 6,9 mm doorsnede zal 50 mg wegen en dus  $2,5 \times 10^7$  cellen bevatten.

De overlevende fractie wordt dan;

$$\text{overlevende fractie (TCD}_{50}) = \frac{51}{2,5 \times 10^7} = 2 \times 10^{-6}$$

Deze waarde is in figuur 28 weergegeven.

Het leek aantrekkelijk, enkele waarden van de overlevende fractie bij andere curatieve doses te berekenen. Hiertoe dient aangenomen te worden, dat er een zekere overeenkomst bestaat tussen de probit-regressielijnen van figuur 25 en figuur 27. Het is nl. een redelijke veronderstelling dat het aantal tumorcellen, dat na bestraling overleeft in een zeker percentage niet-genezen tumoren, gelijk zal zijn aan het aantal tumorcellen, dat nodig is om hetzelfde percentage dieren met tumor te geven bij de celtitraties. Hiermede is dan het aantal overlevende cellen in de tumoren bekend en kan via deze weg de overlevende fractie tumorcellen per Röntgendosis berekend worden, mits tevens het gemiddelde aantal cellen in de bestraalde tumoren bekend is.

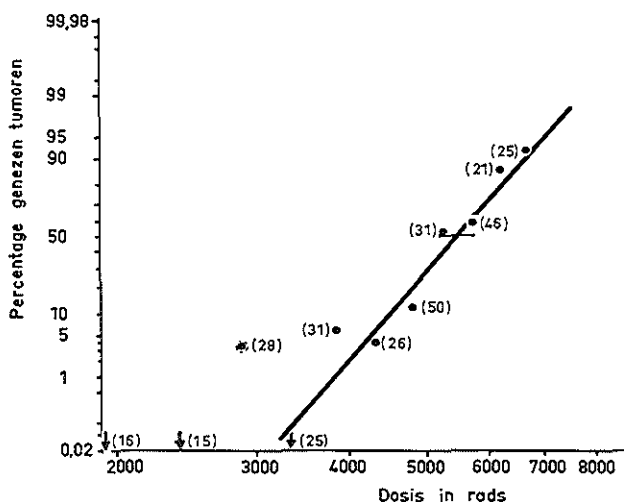
Als voorbeeld moge gelden de berekening voor de Röntgendosis van 6240 rads.

Voorbeeld:

Dosis 6240 rads; genezen 86%  
niet-genezen 14%

Om 14% dieren met tumor te verkrijgen is blijkens de grafiek in fig. 27 een onbestraald inoculum van gemiddeld 2,8 cellen nodig.

Er wordt dus aangenomen dat na een dosis van 6240 rads gemiddeld 2,8 cellen in de tumor overleven. De gemiddelde doorsnede van de tumoren, die met 6240 rads bestraald zijn is 6,19 mm, dit betekent een gemiddeld gewicht van 34 mg. Het gemiddelde cel aantal van de tumoren, die met 6240 rads bestraald zijn is dus  $34 \times 5 \times 10^5$  cellen =  $17 \times 10^6$  cellen.



Figuur 25 RELATIE TUSSEN RÖNTGENDOSIS EN GENEZINGSKANS VAN DE TUMOR.

De gegevens staan vermeld in Tabel XIII, gemiddeld bedroeg de diameter van de bestraalde tumoren 6,9 mm. De getallen tussen haakjes geven het totale aantal dieren per punt aan. De lijn werd berekend met behulp van probit-analyse.

De TCD<sub>50</sub> bedraagt 5460 rads. Het 95% betrouwbaarheidsgebied van de TCD<sub>50</sub> is tevens aangegeven.

Het omcirkelde punt kon bij de probit-analyse worden verwijderd zonder dat de TCD<sub>50</sub> waarde hierdoor werd beïnvloed.

De overlevende fractie zal zijn:

$$\text{overlevende fractie (6240 rads)} = \frac{2,8}{17 \times 10^6} = 1,6 \times 10^{-7}$$

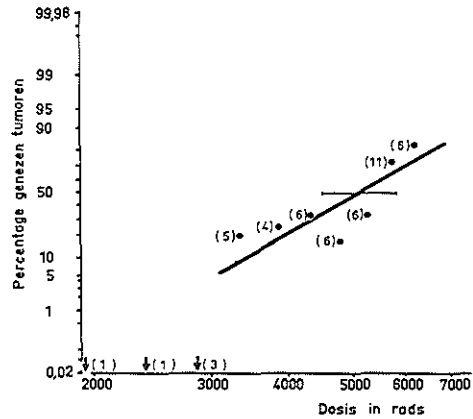
Op overeenkomstige wijze werden de waarden voor 6720, 5760, 5280, 4800 en 4320 rads bepaald en de overlevende fracties uitgezet op semi-logarithmische schaal (zie figuur 28).

Figuur 26 RELATIE TUSSEN RÖNTGENDOSIS EN GENEZINGSKANS VAN DE ZANDKORREL - GROTE TUMOREN.

De gegevens staan vermeld in Tabel XIV. De getallen tussen haakjes hebben betrekking op het totale aantal dieren per punt. De lijn werd berekend met behulp van probit-analyse.

De TCD<sub>50</sub> bedraagt 5208 rads.

Het 95% betrouwbaarheidsgebied van de TCD<sub>50</sub> is tevens aangegeven.



De overlevende fractie van de tumorcellen van de 'zandkorrel'-grote tumoren kanslechts geschat worden, daar een nauwkeurige bepaling van het gewicht van deze tumoren niet mogelijk is. Door een aantal van deze tumortjes zorgvuldig uit te prepareren en gezamenlijk te wegen, kon het gewicht per tumortje op ongeveer 6 mg geschat worden. Het aantal cellen in deze tumoren zal aldus omstreeks  $3 \times 10^6$  bedragen.

De overlevende fractie van de tumorcellen bij de TCD<sub>50</sub> zal dan zijn:

$$\text{overlevende fractie}_{(TCD_{50})} = \frac{51}{3 \times 10^6} = 1,7 \times 10^{-5}$$

Deze waarde is dus slechts een benadering. De TCD<sub>50</sub> is 5208 rads (figuur 26) en de overlevende fractie is uitgezet in figuur 28.

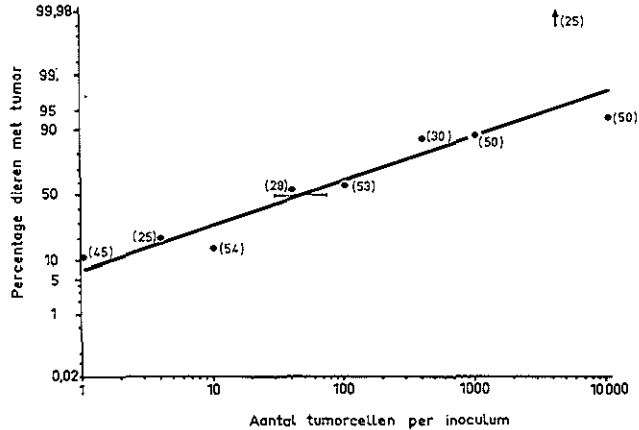
Daaruit blijkt, dat de overleving van tumorcellen in deze minuscule tumortjes op ongeveer dezelfde wijze afhankelijk is van de dosis als die van grotere tumoren.

## Bespreking van de resultaten

In de inleiding van dit hoofdstuk werd het probleem gesteld, of de dosis-effect relatie van tumorcellen na bestraling, zoals bepaald werd met quantitative transplantatie, ook geldig zou zijn tot in het gebied van de curatieve bestraling. In dit hoofdstuk werd de dosis-effect relatie in het curatieve ge-

Figuur 27 RELATIE TUSSEN DE GROOTTE VAN HET CEL-INOCULUM EN HET PERCENTAGE DIEREN, DAT BINNEN 100 DAGEN EEN TUMOR ONTWIKKELDE.

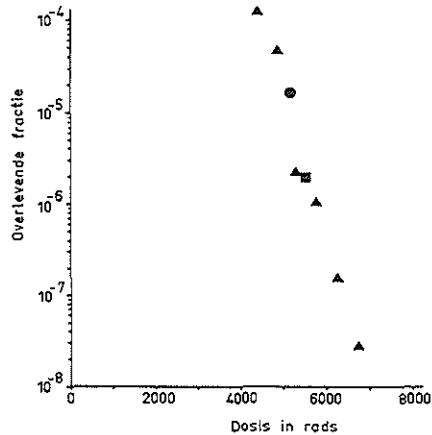
De getallen tussen haakjes hebben betrekking op het totale aantal dieren per punt. De lijn werd berekend met behulp van probit-analyse. De  $ED_{50}$  bedraagt 51 cellen. Het 95% betrouwbaarheidsgebied van de  $ED_{50}$  is tevens aangegeven.



bied nader uitgewerkt en om de gegevens, die met beide systemen werden verkregen te kunnen vergelijken, werdende resultaten van beide groepen experi-

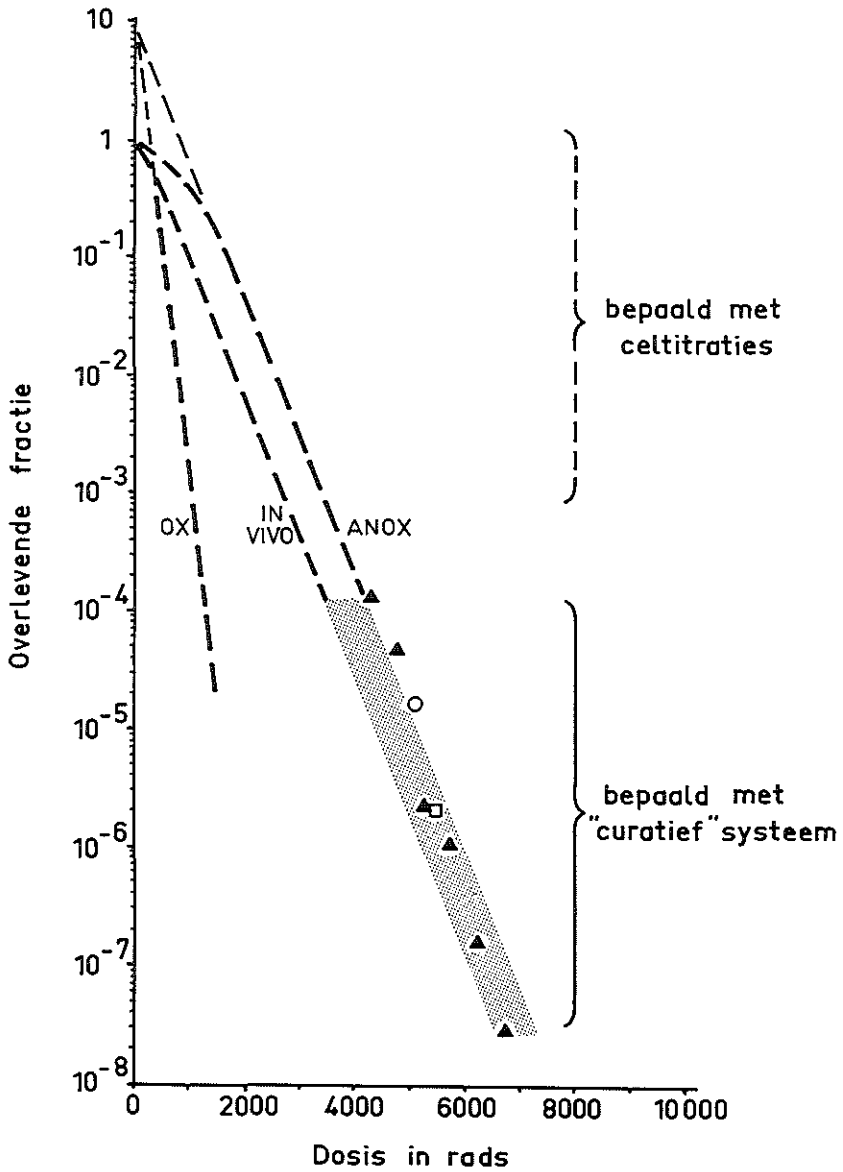
Figuur 28 RELATIE TUSSEN DE 'CURATIEVE' RÖNTGENDOSIS EN DE OVERLEVENDE FRACTIE

- ▲ Punten welke werden berekend uit de genezingspercentages bij verschillende Röntgendoses als vermeld in tabel XIII.
- Overleving van cellen van zandkorrel-grote tumoren, berekend uit de  $TCD_{50}$  en  $ED_{50}$  waarden.
- Additioneel berekend punt. Dit werd verkregen door de  $TCD_{50}$  en  $ED_{50}$  waarden van de probit-analyse (fig. 25 en fig. 27) te gebruiken en heeft betrekking op alle tumoren van tabel XIII (gemiddelde diameter van 6,9 mm).



menten op één diagram (figuur 29) samengevoegd.

Het bovenste gedeelte van dit diagram (tot een overlevende fractie van  $10^{-4}$ ) is afkomstig van figuur 21 uit hoofdstuk IV. Het gearceerde gedeelte geeft de extrapolatie weer van het gebied tussen de '15% en 100% anoxische



Figuur 29 VERGELIJKING VAN DE "CURATIEVE" RESULTATEN EN DE CELOVERLEVINGSCURVEN, ZOALS BEPAALD MET BEHULP VAN QUANTITATIEVE TRANSPLANTATIE. De onderbroken lijnen zijn afkomstig van figuur 21, het gearceerde gedeelte betreft de extrapolatie van het gebied tussen de "15% en 100% anoxische" curven. Tevens zijn de "curatieve" punten van figuur 28 op dit diagram uitgezet.

curven' tot ver beneden het niveau van een overlevende fractie van  $10^{-4}$ . De bovengrens betreft aldus de extrapolatie van de celoverlevingscurve van de anoxisch in situ bestraalde tumor. De iets lager gelegen, evenwijdige grens is die van de celoverlevingscurve, verkregen na bestraling van de tumor in vivo. Wanneer men de punten, die werden verkregen met curatieve bestraling (afkomstig van figuur 28), vergelijkt met genoemde celoverlevingscurven, dan valt het op, dat deze punten liggen in het gearceerde gebied dat begrensd wordt door de beide geextrapoleerde curven. De conclusie lijkt dus gerechtvaardigd, dat de genezingskans na éénmalige bestraling inderdaad voorspeld kan worden door extrapolatie van een celoverlevingscurve die via een tumorceltitratiesysteem verkregen is.

Ondanks de goede overeenstemming tussen de resultaten, verkregen met beide experimentele systemen, blijven er nog een aantal vragen onbeantwoord. In de eerste plaats kan over de juiste vorm van de schouder van de celoverlevingscurve van dit in vivo tumorsysteem nog steeds geen definitief oordeel worden gegeven. Wel suggereren de punten, verkregen met het 'curatieve' systeem, dat het extrapolatiegetal  $N$  inderdaad vrij hoog is. Met het tumorceltitratiesysteem werd gevonden, dat kleine tumoren van dit rhabdomyosaroom ongeveer 15% anoxische cellen bevatten. De met het 'curatieve' systeem gevonden punten doen vermoeden, dat het gehalte anoxische cellen van de bestraalde tumoren iets hoger geweest is. Men dient echter niet uit het oog te verliezen, dat de bepaling van de overlevende fractie van de 'curatieve' experimenten berekend werd uit een groot aantal parameters, te weten: tumordiameter, relatie tumordiameter-gewicht van de tumor, het aantal cellen per gram tumorweefsel en het aantal cellen, nodig voor een bepaald percentage dieren met tumor. Al deze parameters hebben hun eigen onzekerheden. Een standaard afwijking is daarom nauwelijks te berekenen en het is derhalve niet goed na te gaan of het percentage anoxische cellen in b.v. de zandkorrel - grote tumoren significant groter is dan dat in de overige tumoren.

De zandkorrel - grote tumoren werden mede in dit onderzoek betrokken omdat het van belang leek om vast te stellen bij welke tumorgrootte voor het eerst anoxische gebieden voorkomen. Het was immers eerder gebleken (hoofdstuk IV) dat tumoren met een gemiddeld gewicht van 0,4 g reeds duidelijk aantoonbare anoxische gebieden bevatten. Het is uit de figuur op te merken, dat de stralingsgevoeligheid van de zandkorrel - grote tumoren niet essentieel afwijkt van die van de overige onderzochte tumoren. Dit zou verklaard kunnen worden door aan te nemen dat zelfs deze minuscule tumortjes reeds een insufficiënte bloedvoorziening bezitten. De resultaten van dit onderzoek wekken dus de indruk dat - althans bij deze tumor - geen aanwijzingen te vinden zijn, dat er een minimale tumorgrootte bestaat, waarbij géén of een gering gehalte anoxische cellen aanwezig is. De vraag rijst, of het bezit van een zeker gehalte anoxische cellen soms inherent is aan elke tumorgroei. De verschillende factoren, die de zuurstofvoorziening van tumorcellen beïnvloeden, zullen daarom in het volgende hoofdstuk aan een uitvoerige beschouwing worden onderworpen.

\* \* \* \* \*

# VASCULARISATIE EN OXYGENATIE VAN TUMOREN

## Inleiding

In de voorgaande hoofdstukken is meermalen naar voren gekomen, dat een gedeelte van de tumorcellen van het rhabdomyosarcoom BA 1112 in vivo anoxisch is. Vrijwel alle cellen in het lichaam worden van zuurstof voorzien via het bloedvatensysteem en de aanwijzingen dat in de door ons bestudeerde tumor een meetbaar percentage anoxische cellen aanwezig is, alsmede de consequenties daarvan voor de stralingsgevoeligheid van de tumor, maken een nadere beschouwing van de vascularisatie van tumoren noodzakelijk.

Het blijkt uit de literatuur dat in de laatste decennia de vascularisatie van tumoren steeds méér in de belangstelling is gekomen; zowel voor de diagnostiek van gezwellen (arteriografie), maar ook vanwege de betekenis van de zuurstofspanning voor de stralingsgevoeligheid van cellen.

Naarmate men dieper inging op de eigenaardigheden van de vascularisatie van tumoren wijzigde zich het inzicht hierover. De algemeen gehuldigde opvatting 'tumoren hebben een uitstekende bloedvoorziening' was gebaseerd op de sterke neiging tot bloeden van veel tumoren en wijzigde zich in de tegenovergestelde overtuiging, te weten 'tumoren hebben een inferieure bloedvoorziening': (91)

Met alle moderne methoden van onderzoek zijn afwijkingen in de vascularisatie van tumoren gevonden en een overzicht van de literatuurgegevens wordt in tabel XV gegeven. Aan de hand van de in deze tabel vermelde technieken worden de daarmee aangetoonde anomalieën achtereenvolgens besproken.

Daar de in de tabel gerangschikte onderzoeksmethoden géén van alle bruikbaar zijn voor de bestudering van de 'microcirculatie' in tumoren, werd hiervoor een nieuwe techniek ontwikkeld. Het hoofdstuk zal worden besloten met een bespreking van de inzichten die met behulp van deze techniek over de vascularisatie van tumorweefsel werden verkregen.

## Macroscopische onderzoekingen

### Arteriografie

Wanneer men in de Röntgendiagnostiek bloedvaten zichtbaar wil maken, wordt een Röntgencontraststof in een toevoerende arterie geïnjecteerd en in de daarop volgende seconden een serie Röntgenfoto's gemaakt. Deze methode wordt arteriografie genoemd en is onder meer in gebruik voor de diagnostiek



van tumoren, in het bijzonder van die, welke in de extremiteiten, hersenen of nieren\* zetelen.

Doordat een serie foto's snel achtereen gemaakt wordt, kan een indruk verkregen worden van de passage-snelheid van het bloed in het onderzochte orgaan. Het blijkt enerzijds (30) dat in sommige tumoren een deel van het contrast direct van de arteriële naar de veneuze phase gaat; dit wijst op het bestaan van arterio-veneuze shunts. Anderzijds is er vaak 'pooling', waarbij het contrast zich (tijdelijk) ophoopt in verwijde bloedvaten of sinusoiden. Dit laatste werd ook door McAlister bij experimentele tumoren aangetoond (79).

TABEL XV  
LITERATUUROVERZICHT BETREFFENDE BLOEDVATAFWIJKINGEN IN TUMOREN

Methode van onderzoek	Anastomosen	Avasculaire gedeelten	Dilatatie
Macroscopisch Arteriografie Kleurstofdifusie	Contrast direct van arterieele naar veneuze phase Dos Santos (30)	Contrast-arme gedeelten McAlister (79) "Blanke" gedeelten Goldacre en Sylvén (42)	Contrast-ophoppingen ("pooling") Dos Santos (30)
Physiologisch Polarografie Veneuze pO <sub>2</sub>	Te hoog zuurstofgehalte van veneuze bloed Bierman (12)	Plaatsen met geringe pO <sub>2</sub> Cater (19)	
Microscopisch Directe Observatie Histologie	Anastomosen en kruisverbindingen van capillairen Urbach (112)	Grotere intercapillaire afstand in cervix epitheel bij "carcinoma in situ" Kolstadt (72) Gedeelten zonder capillairen Thomlinson en Gray (110) Urbach (112)	Onregelmatig netwerk van verwijde capillairen Algire (2) Verlengde, verwijde en gekronkelde capillairen Urbach (112)

### Kleurstofdifusie

Door Goldacre en Sylvén (42) werd gevonden, dat een intraveneus geïnjecteerde kleurstof (lissamine groen) niet tot in het centrale gedeelte van de door hen onderzochte experimentele tumoren doordrong. De kleurstof verdeelde zich wél homogeen in de perifere gedeelten van de tumor, waarschijnlijk tevens in de extravasculaire vloeistof. Na enige uren bevatten deze perifere gedeelten geen kleurstof meer, maar wél bleek dat een rest hiervan geconcentreerd was in een vrij smalle ring welke gelegen was tussen het centrale en het perifere

\*H. Abrams gebruikt epinephrine om de niervaten te laten contracteren; doordat de bloedvaten van een tumor niet op epinephrine reageren worden deze beter selectief zichtbaar op een Röntgenfoto (1).

gedeelte van de tumor. De verklaring, welke Goldacre en Sylvén hiervoor gaven, was dat de kleurstof het centrale gedeelte van de tumor niet kon bereiken door afwezigheid van bloedvaten aldaar. In het perifere deel was de diffusie homogeen maar werd in enkele uren weer uitgewassen. De kleurstof was inmiddels ongeveer 150  $\mu$  diep in het niet-gevasculariseerde gebied gediffundeerd en was hier geabsorbeerd door de necrotische massa. Hierdoor was een vrij scherp begrensde ring ontstaan op de grens van levend en dood weefsel.

Ook Griffiths (48), die soortgelijke onderzoeken deed met operatiepreparaten van menselijke darmtumoren, kwam tot de conclusie, dat de kleurstof niet tot in het centrale gedeelte van de tumoren doordringt.

## Physiologische onderzoeken

### Bepaling van het zuurstofgehalte van het veneuze bloed

Bij een aantal patienten met tumoren in verschillende delen van het lichaam, waaronder lever en nier, werden door Bierman metingen verricht van de zuurstofspanning in het bloed van de regionale vaten. Bierman vond een geringer verschil in zuurstofspanning tussen het arteriële en het veneuze bloed indien het desbetreffende orgaan tumorweefsel bevatte. Dit wijst op de aanwezigheid van arterio-veneuze shunts of verminderd metabolisme. De bevindingen van Gullino en Grantham met hun fraaie experimentele systeem\* (waarin het mogelijk is om de circulatie in de tumor door slechts één enkel aan- en afvoerdend bloedvat te laten verzorgen), zijn hiermede volledig in overeenstemming (50). De zuurstofconsumptie van deze 'tissue-isolated' tumoren (waaronder hepatomen) bleek soms een factor 15 minder te bedragen dan die van overeenkomstige gezonde weefsels (bijvoorbeeld lever).

Ook zij komen tot de conclusie, dat er abnormaliteiten in de zuurstofopname van een tumor bestaan, welke te wijten kunnen zijn aan een verminderd verbruik van zuurstof door de tumorcellen of aan inferieure uitwisselingsmogelijkheden.

### Polarografie

Meting van de zuurstofspanning in tumorweefsel met behulp van polarografie werd door Cater geïntroduceerd (19). Voor plaatselijke metingen in het weefsel wordt meestal gebruik gemaakt van een dunne electrode van goud of platina waarvan slechts de punt vrij van isolatie is. Met behulp van een elektrisch circuit kan de stroomsterkte worden gemeten welke door de electrode gaat, wanneer daarop een spanning van -0,6 Volt wordt gebracht. Deze stroomsterkte blijkt evenredig te zijn aan de zuurstofspanning van het weefsel waarin de punt van de electrode zich bevindt. Hoe eenvoudig de methode ook is, de kans op het meten van artefacten in plaats van de zuurstofspanning is groot en de methode is meermalen aan critiek onderhevig geweest (102, 36).

Een bezwaar is b.v. dat de ijking van de zuurstof-electrode dient te geschieden in nauwkeurig hetzelfde medium als waarin de meting geschiedt. Daarbij

\*Zie hiervoor bladzijde 22.

zou de plaats van de electrode ten opzichte van de bloedvaten, alsmede de schade die door het inbrengen in het weefsel wordt veroorzaakt bekend moeten zijn voor elke meting. Het is duidelijk, dat aan géén van deze voorwaarden is te voldoen bij een tumor in situ en men dient enigszins voorzichtig te zijn met de interpretatie van de metingen.

Desondanks is uit een groot aantal metingen zowel in menselijke (19) als in dierlijke (65) tumoren gebleken, dat er in vrijwel alle tumoren gebieden bestaan waarin de zuurstofspanning abnormaal laag is.

## Microscopische onderzoeken

### Directe observatie

In de jaren '40 werd door Algire een techniek ontwikkeld om tumorweefsel dat in de subcutis van de muis was geïmplanteerd te kunnen observeren door een 'venster' (2). Ook Algire beschreef een abnormaal vaatsysteem, bestaande uit onderling verbonden verwijde capillairen met vele efferente en afferente vaten (3). Door metingen volgens de methode van Chalkley schatte Algire het volume van het vaatstelsel in procenten van het totale volume van de tumor. Deze waarde bleek soms hoger dan vijftig procent te zijn. Een nadeel van deze methode van directe observatie is, dat het niet uitgesloten geacht moet worden dat deze vascularisatie-index slechts betrekking heeft op die vaten welke zichtbaar zijn aan de buitenzijde van de tumor.

De methode werd door Goodall c.s. (44) enigszins gemodificeerd en gebruikt voor de observatie van tumortransplantaten in de wangzak van de hamster. Goodall meent, dat er specifieke verschillen in vascularisatiepatroon bestaan tussen op deze wijze getransplanteerde melanomen, haemangiopericytomen en mammacarcinomen. De betekenis hiervan is nog moeilijk te schatten, ook al omdat geen gegevens bekend zijn over de invloed van immunologische factoren en dus afweer van de gastheer op de vasculaire architectuur van een aangeslagen tumortransplantaat.

Directe observatie van de bloedvaten van de cervix uteri bij patienten met aandoeningen hiervan werd verricht door Kolstadt (72) met een colposcoop. Ook hij vond onregelmatige vaten en ontdekte tevens dat de intercapillaire afstand in carcinomateus epitheel vergroot was t.o.v. die in normaal cervix-epitheel.

### Histologie

Abnormaliteiten van de capillaire architectuur van menselijke huidtumoren werden beschreven door Urbach en Graham (112). Zij kleurden de capillairwanden in maligne melanomen, plaatepitheelcarcinomen en basaliomen met de alkalische fosfatase techniek volgens Gomori. Hierdoor worden alle bloedvatwanden gekleurd, onafhankelijk van de vullingsgraad. Deze laatste is altijd onzeker door het wegvallen van de druk bij het uitprepareren en door het krimpen van het preparaat bij fixatie.

Urbach en Graham vonden in deze tumoren een toename van het aantal zichtbare capillairen t.o.v. het normale weefsel. Deze waren verwijd en had-

den een gekronkeld verloop, alsmede zeer veel onderlinge anastomosen.

Het is de verdienste van Thomlinson en Gray geweest er op te wijzen dat er een 'critische afstand' kan bestaan, waarop de zuurstofspanning in het weefsel tot nul is gedaald doordat de zuurstofdiffusie over enige afstand van de capillairen onvoldoende is om het zuurstofverbruik van de cellen te compenseren. Deze hypothese werd door hen zowel van histologische - als van theoretische zijde belicht (110).

Sommige plaveiselcel-carcinomen van de bronchi bestaan uit strengen tumorweefsel omgeven door stroma. Thomlinson vond dat wanneer de diameter van deze strengen tumorweefsel een zekere waarde overschreed er steeds in het centrum necrose bestond. De wanddikte van de aldus ontstane cilindervormige van intact tumorweefsel was opmerkelijk constant en op grond van de resultaten van een groot aantal metingen kwam Thomlinson tot de slotsom dat de breedte van de laag intact tumorweefsel, gelegen tussen omgevend stroma en centrale necrose, 160 - 180  $\mu$  bedroeg. Het leek aannemelijk, dat de diffusie van zuurstof niet verder reikte dan deze afstand en Thomlinson en Gray hebben deze gedachte nader uitgewerkt (zie volgende paragrafen) met behulp van een theoretisch model.

## Vasculaire architectuur

Omtrent de ontstaanswijze van het vasculaire patroon van de verschillende typen tumoren zijn geen betrouwbare gegevens bekend; daarom zullen de verschillende tot zover besproken facetten enigszins gegeneraliseerd worden samengevat. Ter illustratie wordt in fig. 30 een stereoscopische microfoto weergegeven van een gedeelte van het vasculaire patroon van het rhabdomyosaroom BA 1112.

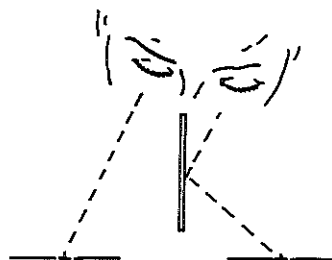
Tijdens de initiële groei van een tumor of metastase in een orgaan zal het daarin aanwezige vaatnet enige tijd aan de metabole eisen van de tumorcellen kunnen voldoen. Indien echter de tumor buiten een dergelijk vaatnet groeit

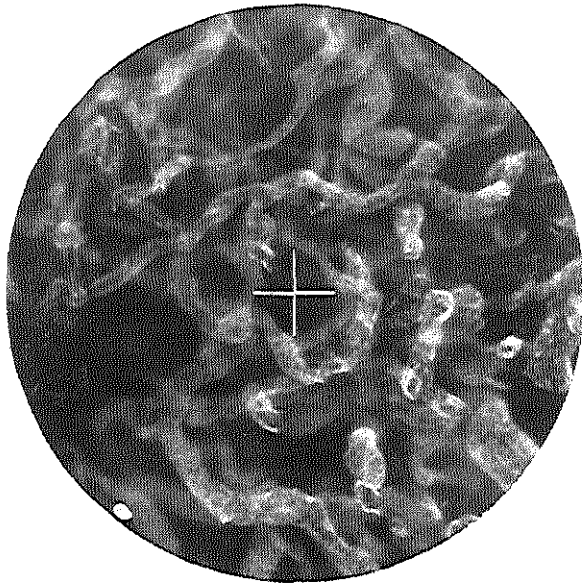
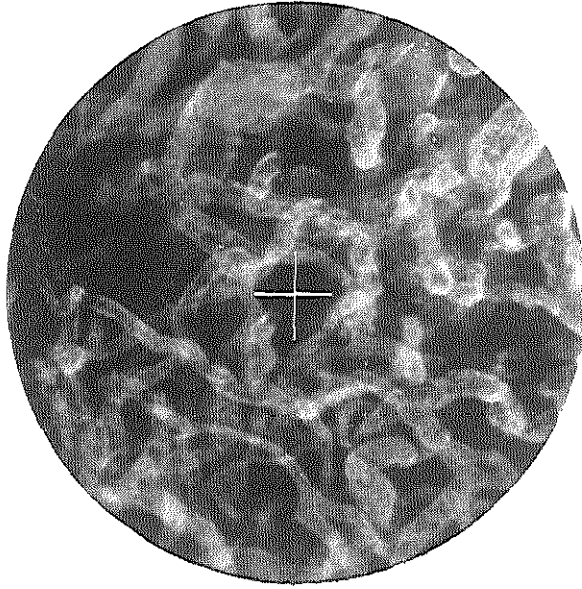
Figuur 30

### DRIE-DIMENSIONALE FLUORESCENTIE-MICROFOTO VAN EEN GEDEELTE VAN HET VASCULAIRE PATROON VAN RHABDOMYOSARCOOM BA 1112.

Vele van de in Tabel XV en in de tekst vermelde afwijkingen zijn op deze foto te bekennen.

Het weefsel werd in transparant medium ingebed (41). De bloedvaten zijn 'in vivo' gemarkeerd door middel van een intraveneus geïnjecteerd fluorochroom-dextran conjugaat. Deze foto's zijn gemonteerd volgens de methode van Becker (10). Voor het stereoscopisch zien dient een spiegel tje vertikaal tegen de rechterzijde van de neus te worden geplaatst op een hoogte van ongeveer 15 cm midden boven het gebied tussen de beide foto's. Het linker oog ziet dan direct de linker foto, het rechter oog de rechter foto via de spiegel. Wanneer voor het oog beide merktekens samenvallen ziet men tevens het bloedvatpatroon stereoscopisch. (x 60).





of infiltreert, ontstaat daar ter plaatse een nieuw bloedvatensysteem dat inferieur is zowel in opbouw als in functie. Bestaande capillairen gaan zich verbreden, worden langer en krijgen vaak een gekronkeld verloop. Lintvormige, uitgerekte capillairen en veneuze sinusoiden ontstaan tengevolge van de expansie van het omgevende tumorweefsel. In de centrale gebieden in de tumor zullen deze vaten vaak geheel gecompriëerd worden, zodat er gebieden ontstaan zonder bloedvoorziening.

Om de tumor heen ontstaat een uitgebreid net van (gedilateerde) capillairen met veel arterio-veneuze anastomosen. Differentiatie in arteriolen en venulae zal meestal ontbreken. Dit vaatnet zal functioneel reeds insufficient zijn, maar kan bovendien na verloop van tijd worden afgesloten door compressie of ingroei van tumorweefsel. Een en ander houdt in dat, wanneer men in een histologische coupe een bloedvat aantreft, het allerm minst zeker is dat de circulatie in dat vat intensief genoeg was om aan de metabole eisen van het omringende tumorweefsel te kunnen voldoen. Het is duidelijk, dat de vascularisatie van een tumor door vele verschillende oorzaken insufficient kan zijn en dat als consequentie daarvan het te verwachten is dat een aantal tumorcellen slecht van zuurstof worden voorzien.

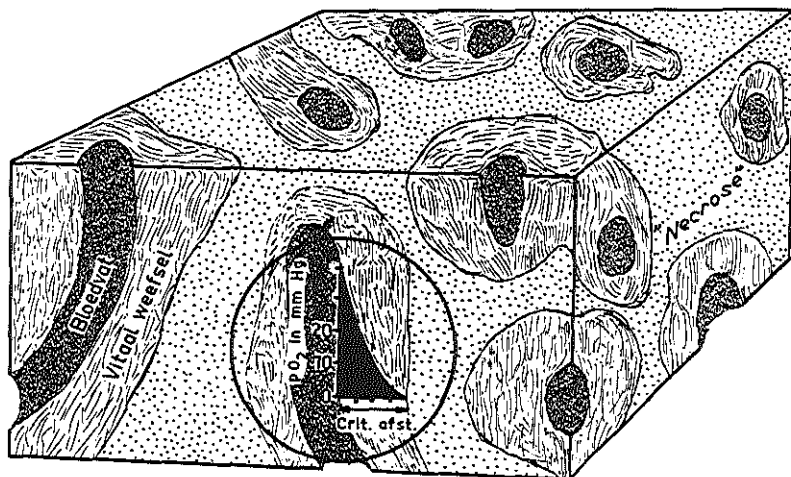
## Zuurstof-diffusie

Zoals eerder genoemd presenteerden Thomlinson en Gray in 1955 een - klassiek geworden - studie, welke het inzicht heeft verruimd over de relatie tussen zuurstofspanning in de bloedvaten en die van het omringende weefsel.

Naar aanleiding van de histologische waarnemingen van Thomlinson (zie vorige paragrafen) werd door Gray langs zuiver theoretische weg de diffusie van een metaboliet in een cilindervormige massa metabool actief weefsel berekend.

De berekeningen van Thomlinson en Gray betroffen voornamelijk de 'critische lengte' van de straal van een weefsel cilinder waarbij de zuurstofspanning in het centrum juist tot nul is gedaald. Deze 'critische afstand' is vanzelfsprekend onder meer afhankelijk van de initiële zuurstofconcentratie in het omgevende stroma en van de diffusiesnelheid van de zuurstof in het weefsel. Bovendien is de - reeds eerder genoemde - zuurstofconsumptie van de cellen in het weefsel van essentieel belang; naarmate de zuurstofconsumptie groter is zal de 'critische afstand' afnemen. Daar de diffusieconstante van zuurstof in tumorweefsel onbekend is hebben Thomlinson en Gray deze geschat op basis van gegevens, die in de literatuur waren opgegeven voor water en spierweefsel. De veneuze zuurstofspanning (40 mm Hg) werd als de initiële concentratie genomen en als waarde voor de zuurstofconsumptie van het weefsel werd het gemiddelde van een aantal metingen gebruikt die door Warburg waren gepubliceerd voor dertien verschillende tumoren (115).

Zij berekenden dat de kritische afstand ongeveer 145  $\mu$  zou bedragen. Dit is een waarde die goed vergelijkbaar is met de door Thomlinson verrichte metingen in histologische coupes, waarbij een afstand van 160  $\mu$  tot 180  $\mu$  gevonden werd tussen omgevend stroma en centrale necrose (Fig. 31.).



Figuur 31 SCHEMATISCHE VOORSTELLING VAN DE OPBOUW VAN TUMORWEEFSEL.

In de cirkel: het weefsel is anoxisch indien de afstand tot de capillairen groter is dan de 'critische afstand'.

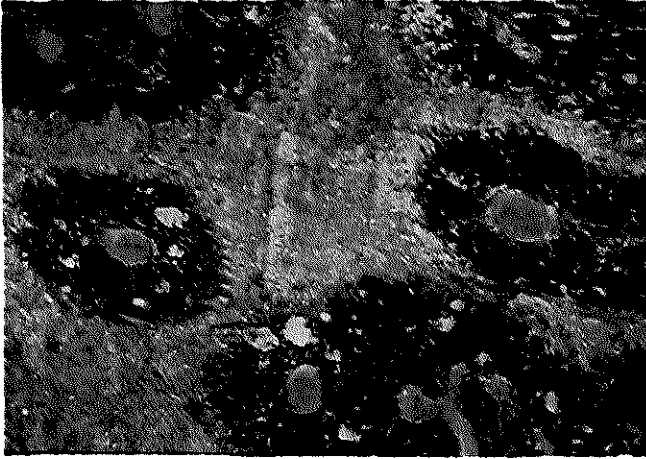
Dat gebieden met necrose ontstaan behoeft niet direct het gevolg van locale anoxie te zijn. De abnormale vascularisatie kan ook leiden tot een teortschieten van de diffusie van nutriënten en tot een versterkte accumulatie van katabolieten als melkzuur. Dit laatste heeft een daling van de zuurgraad ten gevolge hetgeen tot celdood zou kunnen leiden.

Het behoeft geen betoog, dat de berekeningen welke gebruikt werden door Thomlinson en Gray voor de diffusie in een cilindervormige weefselmassa gewijzigd dienen te worden voor andere geometrische verhoudingen. Uit fig. 30 blijkt dat deze verhoudingen zeer gecompliceerd kunnen zijn.

De andere factoren zijn eveneens moeilijk voor een tumor in vivo te bepalen; er bestaan b.v. geen betrouwbare gegevens over de diffusieconstante van zuurstof in tumorweefsel, de zuurstofconsumptie van de tumorcellen in vivo (speciaal bij lage zuurstofconcentraties) en de zuurstofconcentratie in de bloedvaten van de tumor. De enige beschikbare maatstaf voor de beoordeling van vasculaire verhoudingen in tumorweefsel blijft daarom voorlopig de kritische afstand van ongeveer  $150 \mu$ , er mee rekening houdende dat deze tussen de  $100 \mu$  en  $200 \mu$  zal kunnen variëren.

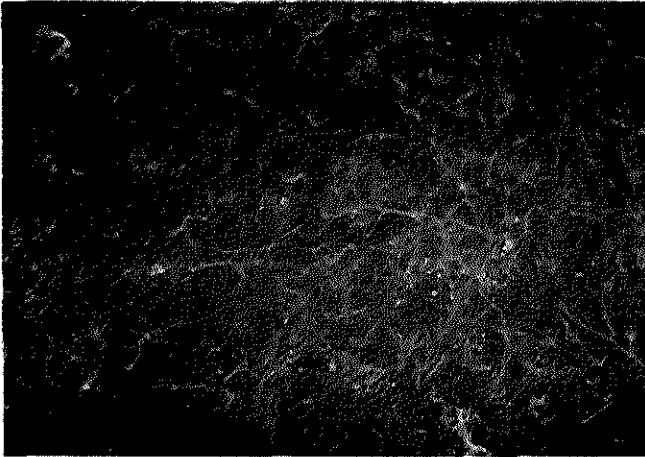
## Eigen onderzoek betreffende de diffusie van kleurstoffen

In hoofdstuk IV werd beschreven dat in het door ons bestudeerde rhabdomyosarcoom 15% anoxische cellen werden gevonden. In de vorige paragrafen werd besproken dat de verklaring hiervoor kan zijn dat de zuurstofvoorziening van de tumorcellen vanuit de capillairen onvoldoende is om het zuurstofver-



Figuur 32

—  
100  $\mu$



Figuur 33



een vriesmicrotoom bij een temperatuur van  $-20^{\circ}$  C gesneden. De nog steeds bevroren coupes worden door middel van vriesdrogen gedehydrateerd en vervolgens zonder verdere kleuring gemonteerd in een fluorescentie-vrij medium.\* De aldus verkregen preparaten worden door een fluorescentie-microscoop bekeken.

## Resultaten

In de zojuist beschreven opstelling hebben de kleurstoffen zich in het levende dier naar de plaatsen begeven waar zij met het fluorescentie-microscoop worden gevonden. Het patroon, dat wordt verkregen met deze fluorescentie-techniek toont zeer veel gelijkenis met het histologische beeld zoals dat door Thomlinson en Gray werd gevonden.

Een voorbeeld hiervan is weergegeven in fig. 32. Het is duidelijk dat het necrotische weefsel zich op enige afstand van de capillairen bevindt. Deze 'critische afstand' kan worden geschat op ongeveer  $100 \mu$  tot  $125 \mu$ . Dat deze afstand enigszins afwijkend is van de door Thomlinson en Gray aangegeven waarde van  $145 \mu$  is niet verwonderlijk, daar er zonder twijfel tussen de diverse tumorsoorten enige verschillen zullen bestaan in de reeds eerder besproken fysiologische parameters. Daarbij zijn er aanwijzingen dat de penetratie van kleurstof in vivo een gevoeliger indicator is voor het opsporen van necrose dan de gebruikelijke histologische technieken (73). Ondanks het feit dat het gebruik van deze techniek een goede indruk geeft van de circulatie-verhoudingen op microscopische schaal, kan het verkregen patroon toch niet zonder meer gelijk geacht worden met dat van de diffusie van zuurstof uit de capillairen. Wel is het redelijk om aan te nemen dat de distributie van zuurstof in het weefsel in grote lijnen zal overeenkomen met het patroon van de diffusie van de fluorochromen; geen zuurstof in de necrotische gedeelten, wél zuurstof in de omgeving van de capillairen.

De diffusie van kleurstof uit een capillair geschiedt overigens niet volgens een radiaal afnemende gradient. Vooral in fig. 33 is een fijn netwerk zichtbaar van smalle rode lijntjes, uitgaande van de bloedvaten.

**Figuur 32** FLUORESCENTIE-MICROFOTO VAN EEN PERICENTRAAL GELEGEN GEDEELTE VAN EEN 14 MM GROTE TUMOR VAN RHABDOMYOSARCOOM BA 1112.

In de necrotische gebieden is het (groen gekleurde) fluorochroom Blankophor G geabsorbeerd, de vasculaire circulatie werd zichtbaar gemaakt door middel van een intraveneuze injectie Kiton-Rhodamine. De levende tumorcellen bevinden zich in het (ongekleurde) gebied tussen capillairen en necrose.

**Figuur 33** FLUORESCENTIE-MICROFOTO VAN HET CENTRALE GEDEELTE VAN EEN ZANDKORREL-GROTE TUMOR VAN RHABDOMYOSARCOOM BA 1112.

De gebruikte *in vivo* kleurtechniek is dezelfde als voor figuur 32. Er bestaat nog géén necrose, wél is de extravasculaire circulatie duidelijk zichtbaar. Het vasculaire patroon van deze minuscule tumor toont reeds heterogeniteiten.

\*Uvivert mountant (Gurr.)

Het is vrijwel zeker dat deze configuratie de extravasculaire stroming weergeeft en als zodanig een visuele representatie is van het reeds door Starling beschreven mechanisme (101). Dit houdt in dat tengevolge van verschillen in bloeddruk en colloïd-osmotische druk van het plasma aan de arteriële zijde van de capillairen vocht uit de bloedbaan treedt. Dit zal na passage van het weefsel aan de veneuze zijde van de capillairen weer worden opgenomen in het bloed. In hoeverre het zuurstoftransport dezelfde regels volgt is onbekend. De snelheid van de extravasculaire stroom zal in de orde van grootte van  $1 \mu$  tot  $10 \mu$  per seconde liggen. Deze waarde kon worden geschat door observatie van het (bevroren!) diffusiepatroon op verschillende tijden na de intraveneuze injectie van het fluorochroom.

Voor zover waarneembaar dringt de extravasculaire vloeistofstroom eigenlijk nooit door tot in de necrotische gebieden. Dit is in dit systeem zeer goed te bepalen daar de gebruikte kleurstoffen volledig verschillend van kleur zijn: necrotisch weefsel wordt blauw-groen en de vasculaire en extravasculaire circulatie rood.

Het lijkt niet onaannemelijk dat de distributie van metabolieten in het (tumor) weefsel voor een deel via de extravasculaire vloeistof-stroom geschiedt.

Als verklaring voor het ontstaan van 'anoxische' gebieden zou kunnen worden gepostuleerd dat - overeenkomstig het model van Thomlinson en Gray - de 'anoxische' cellen verder dan de 'critische afstand' van een capillair liggen, maar dat door de extravasculaire stroming het milieu, waarin deze cellen leven, toch nog enigszins wordt ververst. Accumulatie van katabolieten zoals bijvoorbeeld melkzuur zou dan in mindere mate optreden en necrose zou in die gebieden niet behoeven voor te komen.

Het is duidelijk, dat wanneer een tumorcel niet in anoxisch milieu kan leven, er ook geen anoxische cellen gevonden kunnen worden.

Volgens de zojuist beschreven hypothese zou het gehalte anoxische cellen\* in een tumor dus niet zo zeer bepaald worden door de functie van het bloedvatennet, maar door andere mechanismen welke het de tumorcellen mogelijk maken zich te handhaven in een anoxisch milieu. Wanneer dit milieu door de extravasculaire stroming voldoende wordt ververst, is het niet onmogelijk dat de tumorcellen deze anoxie gedurende lange tijd zullen kunnen verdragen en dat als consequentie hiervan het aantal anoxische cellen hoog zal zijn.

Bij de 'curatieve' bestraling van de zandkorrel-grote tumoren (vorige hoofdstuk) werd gevonden dat de stralingsresistentie van deze minuscule tumoren vrij hoog was. Dit zou verklaard kunnen worden door een relatief hoog percentage anoxische cellen. Daarom werd de in dit hoofdstuk beschreven techniek gebruikt om het vasculaire patroon van deze tumoren nader te onderzoeken.

\*Hoewel in deze beschouwing steeds gesproken is van anoxische tegenover goed-geoxygeneerde cellen, dient niet uit het oog verloren te worden dat de stralingsresistentie van de tumor even goed verklaard kan worden door de aanwezigheid van 15% volledig anoxische cellen als door een veel hoger percentage cellen met een sterk verlaagd gehalte aan zuurstof.

Ondanks de technische moeilijkheden om een dergelijk klein object met het vriesmicrotoom te snijden, is het gelukt om van een serie tumortjes bruikbare preparaten\* te maken. De drooggevroren coupes werden verkregen volgens de in de vorige paragrafen beschreven techniek en waren nooit geheel vlak maar vrij sterk gegolfd. Technisch is het nog niet mogelijk gebleken deze uiterst fragiele coupes tijdens het monteren volledig te strekken. Daarmede verviel ook de mogelijkheid om de verkregen indrukken kwantitatief te verifiëren door metingen aan coupes van tumoren met bijvoorbeeld verschillende diameter. Wel was echter duidelijk dat ook bij de zandkorrel - grote tumoren reeds heterogeniteiten in het vasculaire patroon aanwezig waren (fig. 33) en hoogstwaarschijnlijk was de kritische afstand op een aantal plaatsen overschreden. Necrose werd echter niet gevonden. Dit laatste steunt de eerder genoemde hypothese (blz. 86) dat aan het ontstaan van necrose en van anoxische gebieden in tumorweefsel verschillende mechanismen ten grondslag liggen, die echter beide afhankelijk zijn van de bloedvoorziening. Necrose zou ontstaan door het ontbreken van extravasculaire stroming, anoxie door een wanverhouding tussen het zuurstofverbruik van de cellen en de distributie van zuurstof welke laatste weer afhankelijk is van de intercapillaire afstanden. Volgens de zojuist beschreven criteria is het dus aannemelijk dat ook in deze minuscule tumortjes de voorwaarden voor het ontstaan van anoxische gebieden reeds aanwezig zijn. Dit is geheel in overeenstemming met de waargenomen hoge stralingsresistentie van deze tumoren.

\* \* \* \* \*

\*H. Galjaard en J. Buys (Medisch-Biologisch Laboratorium, RVO - TNO) vervaardigden deze coupes.

# INTERPRETATIE VAN EXPERIMENTEEL VERKREGEN GEGEVENS EN HET BELANG DAARVAN VOOR DE KLINISCHE RADIOTHERAPIE

## Het begrip "stralingsgevoeligheid"

De uitdrukking 'stralingsgevoeligheid' werd in de vorige hoofdstukken vele malen gebruikt en dit noopt tot een nadere bespreking van de verschillende aspecten van dit begrip. Aan de hand van deze bespreking wordt in dit hoofdstuk getracht met behulp van de experimenteel verkregen gegevens, aangevuld met enkele hypothesen, een interpretatie te geven van de klinische ervaringen betreffende stralingsgevoeligheid of stralingsresistentie van een weefsel. In zijn algemeenheid duidt het begrip gevoeligheid van een weefsel of van een organisme op de beïnvloeding van één of meerdere functies daarvan na de toediening van een stimulus. Eén van de klinisch gevaarlijkste - en daarom belangrijkste - functies van maligne tumorweefsel is de progressieve groei. Aan deze progressieve groei ligt een celdelings proces ten grondslag dat zich aan de normale regulatie mechanismen van het lichaam heeft onttrokken.

Het is dus volkomen juist om het in het laatste decennium geïntroduceerde begrip 'sterilisatie door bestraling' als criterium te hanteren voor stralingsschade aan tumorcellen en biochemische, histologische of volumetrische criteria slechts dan te accepteren indien deze informatie kunnen verschaffen over de kwantitatieve aspecten van het sterilisatieproces van de tumorcellen.

## Celoverleving

Wanneer een tumor na een 'curatieve' stralingsdosis tóch na verloop van tijd een recidief toont, betekent dit, dat één of meerdere maligne cellen de bestraling hebben overleefd en dat de stralingsdosis hoger had dienen te zijn om een definitieve vernietiging van alle tumorcellen te bereiken. Het spreekt vanzelf dat, om de grootte van deze dosis te kunnen voorspellen, een aantal gegevens beschikbaar dienen te zijn over de dosis-effect relatie tussen Röntgendosis en het aantal daardoor gesteriliseerde tumorcellen. Met andere woorden: van een te behandelen tumor zou - alvorens de therapie te beginnen - zowel de celoverlevingscurve van de tumorcellen bekend moeten zijn als een aantal andere parameters (zoals de verdeling van de zuurstofconcentratie) die van invloed kunnen zijn op de dosis-effect relatie.

Dit onderzoek had tot doel de factoren te analyseren die de genezingskans van een solide maligne tumor na éénmalige bestraling beïnvloeden. Daarom

werde een experimenteel model gezocht waarmee zowel de celoverlevingscurve als de 'curatieve' dosis-effect relatie te bepalen was. Een transplanteerbaar rhabdomyosaroom van de rat, dat volgens klinische maatstaven als stralingsresistent werd beschouwd, voldeed aan de eisen die aan een dergelijk tumorsysteem werden gesteld. Van dit rhabdomyosaroom werden eerst met behulp van kwantitatieve transplantatie de celoverlevingscurven na bestraling bepaald onder verschillende condities van oxygenatie. Naderhand bleek de genezingskans van deze tumor na éénmalige bestraling inderdaad in overeenstemming te zijn met de verwachtingen op grond van de eerder genoemde celoverlevingscurven.

Uit een groot aantal tumorceltitraties, die voor deze experimenten werden verricht, bleek dat de gemiddelde gevoeligheid van de proefdieren voor het tumorcelinoculum ongeveer 30 cellen bedroeg en dat deze waarde niet significant was te beïnvloeden door een aantal modificaties van de immunologische relatie tussen tumor en gastheer. Of een overeenkomstige tumorcel-gastheer relatie ook bij menselijke tumoren aanwezig is, blijft een open vraag die tengevolge van het ontbreken van de juiste onderzoeksmethoden de eerste jaren nog wel onopgelost zal blijven. Het zij voldoende op te merken dat de celoverlevingscurve na experimentele curatieve bestraling, zoals weergegeven in fig. 29, niet essentieel zal worden beïnvloed indien b.v. een factor 10 minder cellen in de tumor zou overleven dan werd afgeleid uit de tumorceltitraties. Dit rechtvaardigt dus een vergelijking van de uit ons model verkregen informatie met de klinische ervaringen.

Uit onze resultaten blijkt dat de  $D_{37}$  waarde van het rhabdomyosaroom BA 1112 voor bestraling onder anoxische condities ongeveer 380 rads bedraagt, onder goed geoxygeneerde condities ongeveer 120 rads. Deze getallen zijn goed vergelijkbaar met de door Whitmore en Till (117) verzamelde gegevens over in de literatuur opgegeven  $D_{37}$  waarden van een groot aantal sterk uiteenlopende celtypen.

Gemiddeld bedraagt hiervan nl. de  $D_{37}$  waarde voor bestraling in lucht ongeveer 130 rads. Opvallend is ook de grote overeenkomst met de 'anoxische'  $D_{37}$  waarde van ongeveer 380 R die voor een muize-leucaemie werd gevonden door Hewitt en Wilson (60). Daar tumoren van het laatst genoemde type in de klinische praktijk algemeen bekendstaan als zeer stralingsgevoelig is het onwaarschijnlijk dat verschillen in klinische stralingsgevoeligheid te verklaren zullen zijn uit verschillen in  $D_{37}$  waarde. Dit maakt het noodzakelijk andere parameters in beschouwing te nemen, zoals het aantal anoxische cellen in de tumoren en het extrapolatiegetal N.

#### Invloed van anoxie

Het hoge percentage anoxische cellen dat in het rhabdomyosaroom BA 1112 werd aangetoond kan verantwoordelijk worden gesteld voor het feit dat een dosis van meer dan 5000 rads nodig was om de helft van de tumoren te genezen (fig. 29). Dit is volledig in overeenstemming met de theoretische voorstelling dat de zuurstofvoorziening van het tumorweefsel van veel meer betekenis is voor de genezingskans van (een) tumor dan zijn volume, c.q. het aan-

tal te vernietigen tumorcellen (40, 58). Algemeen wordt aangenomen dat gezonde weefsels géén of althans weinig anoxische cellen bevatten, zodat deze weefsels daardoor stralingsgevoeliger zouden zijn dan tumoren, waarin immers een zeker gedeelte van de tumorcelpopulatie door anoxie wordt beschermd!

Om deze ongunstige verhouding van het gezonde weefsel ten opzichte van het tumorweefsel te verminderen zijn de laatste jaren een aantal technieken ontworpen, waarvan sommige reeds worden toegepast zoals het gebruik van stralingsbeschermende stoffen, radiosensitizers en zuurstof onder overdruk en het gebruik van straling met een hoge L.E.T. (11). Een originele benadering van het probleem van de anoxische celpopulatie werd onlangs door enkele Engelse laboratoria geïntroduceerd. Men wil met behulp van een anaëroob levend micro-organisme (*Clostridium butyricum*) de anoxische celpopulatie vernietigen, zodat de overblijvende cellen maximaal stralingsgevoelig zijn! (Lajtha, persoonlijke mededeling).

### Gezonde weefsels

Alvorens over te gaan op een bespreking van de verschillende aspecten van de gefractioneerde radiotherapie dient nog een opmerking gemaakt te worden omtrent de sterk éénzijdige informatie welke de celoverlevingscurve (met als parameters  $D_{37}$  en extrapolatiegetal  $N$ ) geeft over de stralingsgevoeligheid van een weefsel.

De celoverlevingscurve heeft namelijk slechts betrekking op de sterilisatie van cellen. Dit proces behoeft echter niet gepaard te gaan met beschadiging van andere functies van de cellen van het weefsel. Er zijn in het lichaam diverse weefsels die voor een goede functie vrijwel geheel onafhankelijk zijn van de celproliferatie.

Dit zijn bij de volwassen mens bijvoorbeeld de parenchymcellen van de lever, zenuwcellen en spiercellen. Quantitatieve experimentele gegevens over de stralingsbeschadiging van deze weefsels op basis van celoverleving ontbreken nog en volgens de radiologische ervaringen wordt de functie van deze weefsels niet direct merkbaar beïnvloed door bestraling, als de dosis niet te hoog is. Het is echter niet onmogelijk dat - vooral de late - stralingseffecten in sommige van deze weefsels geweten moeten worden aan sterilisatie van andere cellen dan de parenchymcellen, waarbij in de eerste plaats gedacht moet worden aan het bloedvatendotheel. Wanneer men zou veronderstellen dat de endotheelcellen aan een regelmatig proces van vervanging - en dus celdeling - zouden deelnemen, betekent dit dat na verloop van tijd endotheel-defecten zouden kunnen ontstaan tengevolge van mislukte celdelingen.

Het is algemeen bekend dat de late stralenbeschadiging o.a. gekenmerkt is door degeneratieve veranderingen van de bloedvaten.

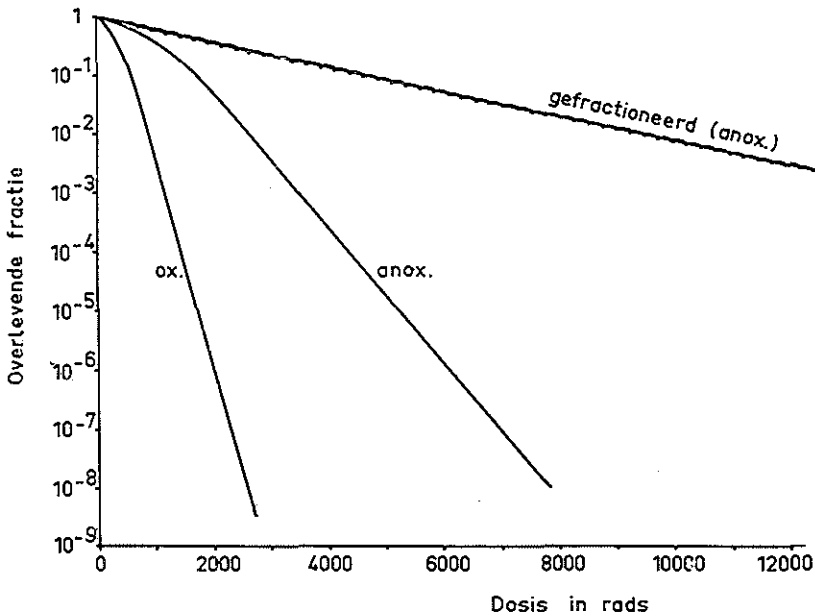
### Invloed van fractionering

Tot zover betref de bespreking van de verschillende factoren die de stralingsgevoeligheid van een weefsel bepalen slechts de sterilisatie van cellen na éénmalige bestraling. Wanneer echter - zoals gebruikelijk is in de kliniek -

de bestraling niet in één keer, maar daarentegen gefractioneerd wordt toegediend, worden nog andere factoren van belang en wel in de eerste plaats de vorm van de 'schouder' van de celoverlevingscurve, veelal uitgedrukt als het 'extrapolatiegetal'  $N$ .

### 'Elkind type' herstel

Door Elkind werd aangetoond dat indien een stralingsdosis in 2 of meer fracties wordt gegeven, het effect - uitgedrukt als het percentage overlevende cellen - minder is dan wanneer de totale dosis ineens wordt toegediend (33). Dit betekent dus dat in de overlevende cellen op de één of andere wijze een gedeelte van de sublethale stralingschade werd hersteld in de periode tussen de twee bestralingen. Indien deze periode lang genoeg is (onder weefselkweekcondities meestal 4 tot 12 uur), blijkt de celoverlevingscurve als het ware weer met een initiële schouder te beginnen. Bij gefractioneerde radiotherapie zou de vorm van de resulterende celoverlevingscurve dan bepaald worden door een repeterende reeks schouders waardoor een belangrijke vermindering van het stralingseffect ontstaat (fig. 34). Naarmate de celoverlevingscurve van een



Figuur 34 THEORETISCHE OVERLEVINGSCURVEN VOOR ANOXISCHE TUMORCELLEN.

Indien de dosis in fracties van 200 rads wordt toegediend zullen aanzienlijk meer cellen overleven (naar Hewitt 56).

tumor een grotere schouder heeft (en dus een hoger extrapolatiegetal) zal dit Elkind type herstel belangrijker zijn en zal de tumor resistenter blijken tegen

gefractioneerde radiotherapie. Het lijkt aannemelijk dat de combinatie van het hoge extrapolatiegetal en het betrekkelijk hoge percentage anoxische cellen van het rhabdomyosaroom BA 1112 grotendeels verantwoordelijk is voor de minimale therapeutische resultaten welke werden verkregen toen de tumor aan een gefractioneerde bestraling werd onderworpen.

Het is te verwachten dat ook in de kliniek de stralingsresistentie van tumoren vaak door de zojuist beschreven factoren zal worden bepaald.

Uit bovengenoemde overwegingen zou men de indruk kunnen krijgen dat - ter vermindering van het Elkind type herstel van de tumorcellen - voor het steriliseren van een tumor een éénmalige dosis Röntgenstralen de voorkeur verdient boven een gefractioneerde therapie. Het dient echter niet uit het oog verloren te worden dat het Elkind type herstel zeker niet de enige factor is die de gehele reactie van weefsels op gefractioneerde bestraling bepaalt! Ook de snelheid van afvoer van dode cellen en de regeneratiesnelheid van het weefsel kunnen geacht worden een belangrijke invloed te hebben op het klinische gedrag van een tumor op bestraling. Hoewel over laatstgenoemde mechanismen vrijwel geen quantitative gegevens beschikbaar zijn, moet het toch wel waarschijnlijk worden geacht dat de in de kliniek ontwikkelde fractioneringsmethoden door dit soort factoren mede worden bepaald.

De sinds de eeuwwisseling opgebouwde klinische ervaring maakt gebruik van verschillen in reactie tussen maligne tumoren en gezonde weefsels op bestraling. Dit verschil komt in het bijzonder bij gefractioneerde bestraling tot uiting. Er bestaat nog steeds geen éénsluitende verklaring voor deze klinische ervaringen waarschijnlijk heeft de clinicus grotendeels op gevoel en ervaring juist die behandelingsschema's geselecteerd, die resulteerden in de beste combinatie van een aantal nader te bespreken factoren.

## Repopulatie

Gedurende een klinische bestralingskuur, die meestal enige weken duurt, zullen zonder twijfel veranderingen plaatsvinden in de samenstelling van zowel de bestraalde tumoren als normale celpopulaties. Als theoretisch model van de reactie van gezond weefsel op gefractioneerde bestraling wordt meestal de huid genomen en hoewel de voorstelling van de - nader te beschrijven - gang van zaken nog steeds op zuiver hypothetische gronden berust, kan een bespreking hiervan toch niet achterwege blijven.

Het theoretische model gaat uit van de volgende gedachtengang: stel dat per dosis straling de levende celpopulatie van de huid juist tot de helft is gereduceerd, dan zal dit aantal weer volledig zijn aangevuld nadat alle overlevende cellen zich éénmaal hebben gedeeld. Indien dit proces van repopulatie voltooid is vóór de volgende stralingsdosis wordt toegediend, zal dit proces zich eindeloos kunnen herhalen zonder dat de huid daarvan blijvende schade ondervindt. Dit zou bijvoorbeeld de verklaring kunnen vormen voor de klinische ervaring, dat bij bewegingstherapie waarbij de huid per oppervlakte-eenheid een zeer geringe 'dagdosis' ontvangt, deze inderdaad vaak nauwelijks beschadigd wordt. Als steun voor deze hypothese wordt vaak aangevoerd dat



gezonde weefsels door hun intensievere celdelingsactiviteit de opgelopen schade sneller zullen kunnen repareren dan de tumoren (34).

Voor de tumor zouden andere processen van meer belang zijn. Een tumor heeft zich per definitie aan de regulatie-mechanismen van de celdeling onttrokken en vaak wordt aangenomen dat de gemiddelde delingsfrequentie in menselijke tumoren geringer is dan die van sommige gezonde weefsels waaronder beenmerg en huid (34). Repopulatie gedurende gefractioneerde radiotherapie kan dus een ondergeschikte rol spelen ten opzichte van andere, nader te bespreken, factoren.

Wanneer een tumor de eerste stralingsdoses heeft ontvangen zal daardoor een belangrijk gedeelte van de goed-geoxygeneerde cellen zijn gesteriliseerd ende meeste van deze cellen zullen definitief te gronde gaan tijdens de eerste (mislukte) celdelingen. De resten van deze cellen zullen, behalve door de lymphbanen, worden afgevoerd via de extravasculaire vloeistofstroom, gedeeltelijk misschien door phagocytosis. Als resultaat hiervan zal de tumormassa in regressie gaan, waardoor de anatomische en physiologische verhoudingen in het tumorweefsel zich zullen kunnen wijzigen.

### Verbeterde oxygenatie

Vooral de laatste jaren is steeds meer de aandacht van de radiobiologen gericht op de bestudering van dit soort mechanismen, daar men een verklaring zocht voor het feit dat het therapeutisch effect van gefractioneerde bestraling op tumoren in de kliniek effectiever was dan men in eerste instantie zou verwachten op grond van de eerder beschreven combinatie van anoxie en Elkind type herstel.

Verondersteld wordt dat ten gevolge van regressieve processen in het tumorweefsel na bestraling de zuurstofvoorziening van de resterende tumorcellen geleidelijk zou verbeteren. Als steun voor deze hypothese zijn enkele aanwijzingen gevonden (11). Door deze - in humane tumoren nog niet voldoende bewezen - verbeterde zuurstofvoorziening van de maligne cellen tijdens gefractioneerde radiotherapie, zou een tumor dus tijdens de behandeling langzamerhand stralingsgevoeliger kunnen worden.

De stralingsgevoeligheid van een tumor voor gefractioneerde bestraling zal dus - indien de zojuist geschetste mechanismen inderdaad een rol spelen - niet alleen afhankelijk zijn van de vorm van de celoverlevingscurve van deze tumor, maar ook van andere factoren, waaronder de groeisnelheid van de tumor. Ook klinische gegevens wijzen in deze richting (15).

## Optimale fractionering; verdere ontwikkeling van het onderzoek

De radiobioloog, die de clinicus wil bijstaan in zijn pogingen om de radiotherapeutische resultaten te verbeteren, beschikt thans nog niet over voldoende informatie. Wat betreft de tumoren is het van belang te weten of de celover-

levingscurven van menselijke tumoren onderling essentiële verschillen zullen vertonen, speciaal in de vorm van de schouder.

Verfijning van de bestaande weefselkweektechnieken zal waarschijnlijk in de nabije toekomst een bepaling van overlevingscurven van direct uit menselijke tumoren geïsoleerde cellen mogelijk maken.

Tevens verdient de vascularisatie - en dus oxygenatie - van tumoren de volle aandacht; informatie hierover zal het beste verkregen kunnen worden door een gecombineerd fysiologisch-morphologisch onderzoek, gebruikmakende van polarografische metingen met behulp van een zuurstof-electrode waarvan de positie naderhand morphologisch wordt geverifieerd.

Met behulp van zuurstofmetingen in vivo zou aldus een indruk kunnen worden verkregen over een verbetering van de oxygenatie van tumoren in het verloop van een bestralingskuur.

Daarnaast zal een uitgebreide studie over de delingssnelheid van de tumorcellen, b.v. met behulp van radio-isotopen, inlichtingen kunnen verschaffen over het te verwachten regressie- of regeneratiepatroon van een tumor na bestraling.

Wanneer ten aanzien van al deze factoren voor elke tumor voldoende gegevens zijn verzameld, is het waarschijnlijk mogelijk geworden om aan te geven hoe groot de minimale tumordosis per fractie dient te zijn in relatie tot het optimale tijdsinterval tussen de fracties. Men dient echter niet uit het oog te verliezen dat dan nog slechts uitsluitend op de reactie van de tumor op bestraling is geleten die van de gezonde weefsels buiten beschouwing is gelaten! Naar aanleiding van het in dit hoofdstuk besprokene zou van de 'critische' gezonde weefsels tenminste onderzocht dienen te worden of de voor sterilisatie gevoelige cellen in deze weefsels zich voldoende kwalitatief en kwantitatief kunnen herstellen tussen de - voor de tumorgenezing optimale - fracties.

Voor de bestudering van celoverleving in de menselijke epidermis is onlangs een originele klinisch bruikbare methode aangegeven (23). Voor de overige weefsels, waaronder het bloedvatendotheel, dienen de onderzoeksmethoden nog te worden ontwikkeld.

Zoals uit de laatste paragrafen duidelijk bleek resteren er - ondanks de vooruitgang in de analyse van de verschillende in dit proefschrift besproken factoren - nog vele onbekende variabelen, welke zich in het bijzonder doen gelden bij gefractioneerde radiotherapie. In de toekomst zal het de taak zijn van zowel klinici als radiobiologen om gezamenlijk al deze factoren te bestuderen zodat de klinicus het optimale behandelingsschema en het maximaal bereikbare therapeutische effect op een meer exacte wijze kan voorspellen dan thans mogelijk is.

\* \* \* \* \*

# SAMENVATTING

Dit proefschrift betreft onderzoeken die werden verricht om tot een analyse te komen van de factoren die van invloed kunnen zijn op de genezingskans van een radioresistente tumor na bestraling.

- I Genezing van een kwaadaardige tumor door bestraling kan slechts worden verkregen door sterilisatie van de maligne cellen en daarom werd bij dit onderzoek veel aandacht besteed aan de bepaling van de dosis-effect relatie tussen Röntgendosis en percentage niet gesteriliseerde - en dus overlevende - cellen. Voor de bepaling van de celoverlevingscurven werd enerzijds gebruik gemaakt van een systeem van celtitraties, anderzijds van een opstelling waarbij de 'genezing' van de tumor als criterium werd gebruikt. De bedoeling van het onderzoek was om deze informatie te verkrijgen voor een solide tumor, bij voorkeur van het stralingsresistente type, omdat t.a.v. zulke tumoren betrouwbare gegevens in de literatuur ontbraken.
- II Uit een overzicht van de literatuur bleek, dat indien dit soort biologische testsystemen - die dus gebruik maken van celtitraties - niet geheel vrij zijn van interfererende immunoreacties, de verkregen resultaten uitermate verwarrend kunnen zijn en een juiste interpretatie daarvan dikwijls onmogelijk is.
- III Na zorgvuldige selectie van de beschikbare transplanteerbare tumoren bleek slechts het rhabdomyosaroom BA 1112, dat isooloog is met de W.A.G./Rij ratstam, aan de hoogste eisen te kunnen voldoen en deze tumor werd daarom voor dit onderzoek gebruikt. Volgens klinische criteria kon deze tumor als stralingsresistent worden beschouwd.

Teneinde de stralingsgevoeligheid van de maligne cellen van deze tumor nauwkeurig te kunnen bepalen, werd eerst een methode ontwikkeld om deze cellen onbeschadigd uit het tumorweefsel te isoleren. Hiertoe werd gebruik gemaakt van een gecombineerde mechanische en enzymatische methode; de levende tumorcellen werden door middel van het enzym trypsine in een speciaal roerapparaat gedispergeerd. Met de aldus verkregen cellen werden - al dan niet in combinatie met bestralingsexperimenten - tumorceltitraties verricht. Daartoe werden proefdieren die als gastheer dienden onderhuids op de kop ingespoten met bepaalde aantallen cellen en het percentage dieren, dat binnen een termijn van 100 dagen ter plaatse van de injectie een tumor vertoonde, werd gebruikt voor de berekening van de ED<sub>50</sub>; dat is die celdosis, welke na inoculatie zal resulteren in 50% dieren met tumor. De controle (onbestraalde) ED<sub>50</sub> varieerde enigszins gedurende de periode van ongeveer 2 jaar waarover de experimenten zich uitstrekten (11 tot 80 cellen). De ED<sub>50</sub> van bestraalde cellen werd mede bepaald door de Röntgendosis en kon oplopen tot meer dan 100.000 cellen.
- IV De 'anoxische' celoverlevingscurve werd bepaald door bestraling van de tumor in het dode dier met doses van 480 tot 3840 rads. Een D<sub>37</sub> waarde van ongeveer 380 rads werd gevonden en een extrapolatie-

getal van omstreeks 10. Deze  $D_{37}$  waarde is van dezelfde orde van grootte als die welke door anderen voor een muize-leucaemie was bepaald. Deze bevinding suggereert dat de celoverlevingscurven van stralingsresistente en stralingsgevoelige tumoren overeenkomstige  $D_{37}$  waarden zullen bezitten. Het extrapolatie getal  $N \approx 10$  van de celoverlevingscurve van het rhabdomyosarcoom is echter waarschijnlijk wel hoger dan dat van de diverse muize-leucaemieën. Door tumorcellen in suspensie te bestralen onder doorleiding van lucht werd de 'goed-geoxygeneerde' celoverlevingscurve bepaald. Uit de aldus verkregen gegevens werd de zuurstof-versterkingsfactor berekend, deze bleek 3 te bedragen. Deze waarde is voor allerlei andere biologische systemen eveneens gevonden. Door bestraling met doses van 480 tot 3840 rads van tumoren met een gemiddeld gewicht van 0,4 gram ( $2 \times 10^8$  cellen) in het levende, niet genarcotiseerde dier, werd de in vivo curve bepaald. Uit de drie curven, te weten de 'anoxische', de 'goed geoxygeneerde' en de in vivo curve, kon worden afgeleid dat deze kleine tumoren reeds 15% anoxische cellen bevatten.

V De opvatting dat de stralingsresistentie van een dergelijke tumor hierdoor in belangrijke mate zal worden beïnvloed werd gesteund door de resultaten van een serie 'curatieve' experimenten.

Deze proeven werden verricht om na te gaan of de resultaten, verkregen met behulp van tumorceltitraties, aanwijzingen zouden kunnen geven over de genezingskans van de tumor na éénmalige bestraling. Daartoe werd een grote serie experimenten verricht waarin de tumor lokaal werd bestraald met hoge doses, die varieerden van 1920 tot 6720 rads.

De Röntgendosis welke in 50% van de proefdieren de tumor deed genezen (T C D 50) bedroeg 5460 rads voor de grote groep van tumoren met een diameter van 4 t/m 15 mm (gemiddelde diameter 6,9 mm) en 5208 rads voor zandkorrel-grote tumoren. In een contrôle serie werd door middel van tumorceltitraties de ED<sub>50</sub> bepaald; deze bedroeg 51 cellen. Het aantal cellen in tumoren van 6,9 mm werd geschat op  $25 \times 10^6$ , dat van de zandkorrel-grote tumoren op  $3 \times 10^6$ . Met behulp van deze gegevens was het mogelijk de overlevende fractie van de tumorcellen na bestraling te berekenen; deze bedroeg respectievelijk  $2 \times 10^{-6}$  en  $1,7 \times 10^{-5}$ . Het bleek mogelijk voor andere Röntgendoses (en dus genezingspercentages) de bijbehorende overlevende fracties te berekenen. De resultaten bleken inderdaad in overeenstemming te zijn met wat verwacht mocht worden op grond van extrapolatie van de eerder genoemde 'in vivo' celoverlevingscurve.

De conclusie lijkt dus gerechtvaardigd dat de genezingskans van solide tumoren na éénmalige bestraling voorspeld kan worden uit gegevens, verkregen met quantitative transplantatietechnieken. Opmerkelijk was dat waarschijnlijk het gehalte anoxische cellen in de minuscule zandkorrel - grote tumoren in dezelfde orde van grootte ligt als dat van de grotere bestraalde tumoren.

De belangrijke invloed welke dit percentage anoxische cellen blijkt te hebben op de stralingsgevoeligheid van de tumor als geheel, leidde tot nader onderzoek naar de oorzaak van deze anoxie. Daar de zuurstofconsumptie van de tumorcellen van het rhabdomyosarcoom weinig bleek te verschillen van de waarden die opgegeven zijn voor andere tumoren, diende de oorzaak van de

aanwezigheid van anoxische gebieden in het tumorweefsel gezocht te worden in de vascularisatie van de tumor.

- VI Uit de literatuur bleek reeds dat de vascularisatie van tumoren op vele manieren abnormaal en insufficient kan zijn en dat het te verwachten is dat op 0,1 à 0,2 mm afstand van een capillair de zuurstofspanning tot 0 is gedaald. Deze geringe afstand maakte het noodzakelijk de circulatoire verhoudingen in het tumorweefsel op microscopische schaal te bestuderen en daartoe diende eerst een nieuwe techniek te worden ontwikkeld. De beste oplossing hiervoor werd gevonden door gebruik te maken van fluorescerende kleurstoffen die intraveneus of intraperitoneaal in het levende dier kunnen worden ingespoten, waarna zij zich via de bloedstroom over de weefsels verdelen. Doordat fluorescerende kleurstoffen in zeer geringe concentraties kunnen worden aangevoerd is het mogelijk na toepassing van speciale histologische technieken (w.o. vriesdrogen) een indruk te verkrijgen over de bloedsomloop in de capillairen van de tumor. Daarbij kunnen ook necrotische gebieden reeds in het levende dier gekleurd worden met fluorochromen.

Het bleek dat er aanzienlijke heterogeniteiten in het bloedvatpatroon van het rhabdomyosaroom aanwezig waren, alsmede centraal gelegen necrotische gebieden. De afstand van de capillairen tot de grens van de necrotische gebieden bedroeg ongeveer 100  $\mu$  tot 125  $\mu$ . Ook de zandkorrel - grote tumoren toonden duidelijke heterogeniteiten in het capillairnet, overigens zonder dat reeds necrose in het weefsel was aan te tonen. Deze bevindingen steunen de veronderstelling dat inderdaad een belangrijk gedeelte van de tumorcellen anoxisch is, in overeenstemming dus met de conclusies verkregen via de cel-overlevingscurven. Tevens werden met deze speciale microscopische techniek configuraties gevonden die werden toegeschreven aan de extravasculaire stroming en de hypothese werd geponeerd dat de anoxische, maar toch levende tumorcellen, slechts dankzij deze extravasculaire stroming hun metabolisme in stand kunnen houden.

- VII De verschillende variabelen die kunnen optreden bij gefractioneerde bestraling en de rol hiervan ten aanzien van de differentieële stralingsgevoeligheid tussen tumor en gezonde weefsels vormden het volgende punt van bespreking. Dit betrof o.a. het intracellulaire herstel, regeneratie van celpopulaties en veranderingen in de vascularisatie en oxygenatie van tumoren.

Ten aanzien van de stralingsgevoeligheid van niet-prolifererende gezonde organen werd de suggestie gedaan dat bepaalde weefsels zoals het bloedvat-endothelium in deze organen wel aan vernieuwing - endus proliferatie - onderhevig zijn en dat diensgevolge de stralingsgevoeligheid van bloedvat-endotheliumcellen bepalend zou kunnen zijn voor de late stralingsschade die in deze organen optreedt.

Tenslotte werd besproken welke factoren nog onderzocht dienen te worden voordat aan de radioloog een op radiobiologische gegevens gebaseerd behandelingsprogramma kan worden voorgesteld.



## SUMMARY

- I This thesis deals with investigations concerning the analysis of factors influencing the cure rate of a radioresistant tumour after irradiation. A malignant tumour can only be cured by irradiation after sterilization of the malignant cells; much attention was therefore paid to the determination of the dose-effect relation, i.e. the relationship between the X-ray dose and the fraction of cells surviving the treatment. The cell survival curves were determined by Hewitt's assay as well as by experiments in which the cure rate of the tumour was the criterium. The main purpose of these investigations was to obtain this kind of information from a solid tumour, preferable a radioresistant one, because no reliable published data concerning experiments with that type of tumour were available.
- II A survey of the literature showed that this kind of biological assay - employing tumour cell titrations - can give rather confusing results if immunological factors play a role and this can make their interpretation rather difficult.
- III After careful selection of various available transplantable tumours a rhabdomyosarcoma (the BA 1112, isologous in the WAG/Rij strain of rats) met the requirements and was used for these investigations. According to clinical criteria this tumour could be assumed to be radioresistant. To be able to determine its radiosensitivity, a method, permitting the isolation of the malignant cells from the solid tumour tissue had first to be devised. To this end a combined mechanical and enzymatic technique was employed in which the living tumour cells were dispersed by trypsinization in a special mixer. The isolated cells were used for tumour cell titrations, also after prior irradiation of the intact tumour or of the cell suspensions. The host animals were inoculated subcutaneously on the head with graded numbers of cells and the percentage of animals showing a tumour at the site of inoculation within 100 days was used for the calculation of the ED<sub>50</sub> i.e. the number of inoculated cells resulting in 50% tumour 'takes'.

The (unirradiated) control ED<sub>50</sub> value showed some seasonal variations between 11 and 80 cells, the mean value was in the order of 30 cells.

The ED<sub>50</sub> of the irradiated cells obviously depended on the X-ray dose received and approached values of 100,000 cells or more.
- IV The 'anoxic' curve was obtained by irradiation of the tumour cells in the dead animal with doses from 480 to 3840 rads. The D<sub>37</sub> value (the usual parameter for the slope of the cell survival curve) was found to be about 380 rads. The extrapolation number (indicating the intercept of the extrapolated cell survival curve with the ordinate) was approximately 10. These figures, when compared with results obtained by others with a murine leukaemia, suggest that the D<sub>37</sub> value of the survival curves for cells from radiosensitive and radioresistant tumours are similar, although there seem to be differences in the extrapolation numbers.

The 'well oxygenated' curve was obtained by irradiation of aerated tumour cell suspensions. An oxygen enhancement ratio of 3 was found which is in the range of the values usually obtained for biological systems. By delivering doses between 480 en 3840 rads to small tumours with an average weight of 0.4 g (containing approx.  $2 \times 10^8$  cells) in the living, non-anaesthetized animals, the cell survival curve of the in vivo tumour was estimated. From the shape of the various curves it was deduced that 15% of the cells of these small tumours had probably been in an anoxic state at the time of irradiation.

- V The assumption that such a proportion of anoxic cells has a considerable influence on the radiosensitivity of tumours was further supported by the results of a series 'cure rate' experiments. These experiments were performed to verify whether the results, obtained by tumour cell titrations would agree with the tumour cure rate after irradiation. To this purpose a large series of experiments was performed in which the tumour was irradiated locally with high doses of X-rays, ranging from 1920 to 6720 rads. The X-ray dose resulting in 50% 'cures' was 5460 rads, for a group of tumours with a mean diameter of 6.9 mm and 5208 rads for a group of 'sand-grain' sized tumours. In separate experiments the  $ED_{50}$  was determined by tumour cell titrations. The average number of cells in the first group of tumours was about  $25 \times 10^6$  cells, the 'sand-grain' sized tumours contained approximately  $3 \times 10^6$  cells. Using these data, the values of the surviving fractions after irradiation could be calculated to be  $2 \times 10^{-6}$  and  $1.7 \times 10^{-5}$  respectively. The conclusion seems justified that the cure rate of solid tumours after a single dosis of X-rays can indeed be predicted by data, obtained from cell titrations of irradiated tumours. It was noteworthy that the proportion of anoxic cells in the tiny 'sand-grain' sized tumours was apparently of the same magnitude as that in tumours of a tenfold larger size.
- VI Since the oxygen consumption of the tumour cells of the rhabdomyosarcoma proved to be in the same range as the values published for various other tumours, the reason for the presence of anoxic areas in the tumour tissue should be sought in the vascularization of the tumour. Published data show that the vascularization of tumours is likely to be abnormal and insufficient in many different ways and that a zero oxygen tension may be expected at a distance of 0.1 to 0.2 mm from the capillaries.
- The microscopical study of the vascular relations in the tumour tissue required a refined technique which had to be developed. Application of fluorescent dyes was most suited to this purpose; they were injected either intraperitoneally or intravenously in the living animals and thus distributed by the blood stream to the various tissues. By freeze-drying and preparation of cryostat sections the fluorescent dyes could be demonstrated in very low concentrations making it possible to study several aspects of the microcirculation in the tumour tissue. These observations revealed a considerable heterogeneity in the vascular pattern of the rhabdomyosarcoma as well as the presence of centrally located necrotic areas. The distance from the capillaries to the border of the necrotic areas was about  $100 \mu$  to  $125 \mu$ . The 'sand-grain' sized tumours also showed heterogeneity in the capillary network, however without any apparent



necrosis. These findings seem to support the idea that a proportion of the living tumour cells can indeed exist under hypoxic conditions, due to an insufficient vascular supply which would be in accordance with the conclusions drawn from the cell survival curves. With the fluorescent microscopic technique certain patterns were observed which could only be attributed to an extravascular circulation and the assumption was made that anoxic but nevertheless living tumour cells, can maintain their metabolism because of this type of extravascular supply of nutrients and removal of catabolites.

VII The final point of discussion was concerned with variables which may be operative during fractionated radiotherapy and the possible role they may play in determining the difference in radiosensitivity between tumour and normal tissues. The main factors concerned are likely to be the intracellular repair of radiation damage, the rate of regeneration of the cell population and changes in tumour vascularization and oxygenation. With respect to the radiosensitivity of normal tissues consisting of cells which show hardly proliferation, one should remember that for instance certain constituents of these tissues, e.g. the blood vessel endothelium, may be prone to renewal and thus to proliferation. Consequently, the late damage of such tissues or organs may well depend upon the radiosensitivity of these very structures.

In conclusion a survey was made of certain factors which should be approached experimentally before any treatment schedule based on radiobiological data can be proposed to the radiotherapist.



# LITERATUUR

- 1 Abrams, H.L. Altered drug response of tumour vessels in man. *Nature*, 201, 1964, 167.
- 2 Algire, G.H. Chalkley, H.W. Legallais, F.Y. and Park, H.D. Vascular reactions of normal and malignant tissues *in vivo*. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J. nat. Cancer Inst.* 6, 1945-46, 73.
- 3 Algire, G.H. and Legallais, F.Y. Vascular reactions of normal and malignant tissues *in vivo*. IV. The effect of peripheral hypotension on transplanted tumors. *J. nat. Cancer Inst.* 12, 1952, 399.
- 4 Algire, G.H., Weaver, J.M. and Prehn, R.T. Growth of cells *in vivo* in diffusion chambers. I. Survival of homografts in immunized mice. *J. nat. Cancer Inst.* 15, 1954, 493.
- 5 Alper, T., Fowler, J.F., Morgan, R.L., Vonberg, D.D., Ellis, F., and Oliver, R. The characterisation of the 'Type C' survival curve. *Brit. J. Radiol.* 35, 1962, 722.
- 6 Andrews, J.R. and Berry, R.J. Fast neutron irradiation and the relationship of radiation dose and mammalian tumor cell reproductive capacity. *Radiat. Res.* 16, 1962, 76.
- 7 Balner, H. Bone marrow transplantation after whole-body irradiation. Proefschrift, Amsterdam, 1963.
- 8 Barendsen, G.W. Damage to the reproductive capacity of human cells in tissue culture by ionizing radiations of different linear energy transfer. *In* The initial effects of ionizing radiations on cells, a symposium, October, 1960, London, Academic Press, 183.
- 9 Barendsen, G.W. Effects of single and repeated low doses of ionizing radiations on the proliferative capacity of human cells in culture. *In* Cellular Radiation Biology, 1965, Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 469.
- 10 Becker, J.A. Stereoscopic illustrations. *Amer. J. Roentgenol.* 94, 1965, 733.
- 11 Bekkum, D.W. van, Experimentele modificatie van de stralingsgevoelig-

- heid van normale en maligne celpopulaties. In: Het Jaarboek van kanker-onderzoek en kankerbestrijding in Nederland, deel 16, 1966, Amsterdam. J.H. de Bussy (in druk)
- 12 Bierman, H.R., Kelly, K.H. and Singer, G. Studies on the blood supply of tumors in man. IV. The increased oxygen content of venous blood draining neoplasms. *J. nat. Cancer Inst.* 12, 1952, 701.
  - 13 Boyse, E.A. A method for the production of viable cell suspensions from solid tumors. *Transplant. Bull.* 7, 1960, 100.
  - 14 Brenk, H.A.S. van den, Elliot, K. and Hutchings, H. Effect of single and fractionated doses of X-rays on radiocurability of solid Ehrlich tumor and tissue reactions in vivo, for different oxygen tensions. *Brit. J. Cancer* 16, 1962, 518.
  - 15 Breur, K. Groeisnelheid en stralengevoeligheid van gezwellen bij de mens. Proefschrift, Leiden, 1965.
  - 16 Broerse, J.J. Effects of energy dissipation by monoenergetic neutrons in mammalian cells and tissues. Proefschrift, Amsterdam, 1966.
  - 17 Bush, R.S. and Bruce, W.R. The radiation sensitivity of transplanted lymphoma cells as determined by the spleen colony method. *Radiat. Res.* 21, 1964, 612.
  - 18 Bush, R.S. and Bruce, W.R. The radiation sensitivity of a transplanted murine lymphoma as determined by two different assay methods. *Radiat. Res.* 25, 1965, 503.
  - 19 Cater, D.B. Oxygen tension in neoplastic tissues. *Tumori* 50, 1964, 435.
  - 20 Clifton, K.H., Briggs, R.C. and Stone, H.B. Factors influencing cell survival in solid carcinomas irradiated in vivo: effect of anoxia and chemotherapy. In: Third international congress of radiation research. Cortina d'Ampezzo, 1966. Abstract no. 211.
  - 21 Clifton, K.H. and Draper, M.R. Survival-curves of solid transplantable tumour cells irradiated in vivo: a method of determination and statistical evaluation; comparison of cell-survival and <sup>32</sup>P-uptake into DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 7, 1963, 515.
  - 22 Cohen, A. and Cohen, L. Estimation of the cellular lethal dose and the critical cell number for the C<sub>3</sub>H mouse mammary carcinoma from radio-sensitivity studies in vivo. *Nature* 185, 1960, 262.

- 23 Cohen, L. Pigment mosaics in irradiated human skin: a new test of cellular survival curve theory. *Brit. J. Radiol.* 39, 1966, 533.
- 24 Collins, V.P., Loeffler, R.K. and Tivey, H. Observations on growth rates of human tumors. *Amer. J. Roentgenol.* 76, 1956, 988.
- 25 Craigie, J. A pressure mincer for the preparation of tumour suspensions. *Brit. J. Cancer* 3, 1949, 249.
- 26 Craigie, J. A quantitative approach to the study of transplantable tumours. *Brit. med. J.* 2, 1949, 1485.
- 27 Delorme, E.J. A simple method for the accurate volumetric measurement of superficial tumours. *Brit. J. Cancer* 19, 1965, 336.
- 28 Dische, Z. Color reactions of nucleic acid components. *In: The nucleic acids*, vol. 1, 1955, 285, New York, Academic Press.
- 29 Dongen, J.A. van. Haematogene metastasen. Proefschrift, Amsterdam, 1961.
- 30 Dos Santos, R. Arteriography in bone tumours. *J. Bone Jt Surg.* 32B, 1950, 17.
- 31 Du Sault, L.A. The influence of the time factor on the dose-response curve. *Amer. J. Roentgenol.* 87, 1962, 567.
- 32 Du Sault, L.A. and Kasenter, A.G. Jr., 'Cure' or 'Control' of tumors? *Radiology*, 86, 1966, 444.
- 33 Elkind, M.M. Cellular aspects of tumor therapy. *Radiology* 74, 1960, 529.
- 34 Ellis, F. My philosophy of radiotherapy. *Brit. J. Radiol.* 36, 1963, 627.
- 35 Epstein, S.S. Lung as a transplant site for malignant tumors in rodents. *Cancer* 19, 1966, 454.
- 36 Evans, N.T.S. and Naylor, P.F.D. The measurement of partial pressure of oxygen *in vivo*. *J. Polarograph. Soc.* no. 2, 1960, 2.
- 37 Feder, B.H. and Boutelle, J.L. Tumour transplantation; a simple technique. *Nature* 205, 1965, 508.
- 38 Fisher, E.R. and Fisher, B. Experimental studies of factors influencing the development of hepatic metastases. XIII. Effect of hepatic trauma in parabiotic pairs. *Cancer Res.* 23, 1963, 896.

- 39 Foley, E.J. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* 13, 1953, 835.
- 40 Fowler, J.F. Radiation biology as applied to Radiotherapy. In: *Current topics in radiation research*, vol. II, 1965, 305, Amsterdam, North-Holland Publ. Comp.
- 41 Galavazi, G. Clearing and staining plant material in toto with phloroglucinol-HCl in methyl benzoate for projection photography and subsequent serial sectioning. *Stain Technol.* 40, 1965, 1.
- 42 Goldacre, R.J. and Sylvén, B. On the access of blood-borne dyes to various tumour regions. *Brit. J. Cancer* 16, 1962, 306.
- 43 Goldfeder, A. Radiosensitivity and biological properties of two tumour-types indigenous to the same host. IV. Effect of single and multiple X-ray treatments on tumour regression. *Int. J. Radiat. Biol.* 4, 1962, 537.
- 44 Goodall, C.M., Sanders, A.G. and Shubik, P. Studies of vascular patterns in living tumors with a transparent chamber inserted in hamster cheek pouch. *J. nat. Cancer Inst.* 35, 1965, 497.
- 45 Gray, L.H. Radiobiologic basis of oxygen as a modifying factor in radiation therapy. *Amer. J. Roentgenol.* 85, 1961, 803.
- 46 Greene, H.S.N. The use of the mouse eye in transplantation experiments. *Cancer Res.* 7, 1947, 491.
- 47 Greenstein, J.P. In: *Biochemistry of Cancer*, 1954, 451, New York, Academic Press.
- 48 Griffiths, J.D. Vascularization of tumors of the colon and rectum: with particular reference to dissemination of cancer cells through the venous system and the relationship of perfusion or infusion of cytotoxic drugs to the blood supply of these tumors. *Dis. Colon Rect.* 8, 1965, 114.
- 49 Gullino, P.M. and Grantham, F.H. Studies on the exchange of fluids between host and tumor. I. A method for growing 'tissue-isolated' tumors in laboratory animals. *J. nat. Cancer Inst.* 27, 1961, 679.
- 50 Gullino, P.M. and Grantham, F.H. Studies on the exchange of fluids between host and tumor. II. The blood flow of hepatomas and other tumors in rats and mice. *J. nat. Cancer Inst.* 27, 1961, 1465.

- 51 Hewitt, H.B. Transplantation of mouse sarcoma with small numbers of single cells. *Nature* 170, 1952, 622.
- 52 Hewitt, H.B. The mechanics of subcutaneous injection. *Brit. J. exp. Path.* 35, 1954, 35.
- 53 Hewitt, H.B. The quantitative transplantation of sarcoma 37 into subcutaneous air pouches in mice. *Brit. J. Cancer* 10, 1956, 564.
- 54 Hewitt, H.B. Studies of the dissemination and quantitative transplantation of a lymphocytic leukaemia of CBA mice. *Brit. J. Cancer* 12, 1958, 378.
- 55 Hewitt, H.B. Transplantation of murine leukaemia by unconventional routes, *Nature* 191, 1961, 1213.
- 56 Hewitt, H.B. Fundamental aspects of the radiotherapy of cancer. In: *The scientific basis of medicine, annual reviews, 1962*, 305. British Postgraduate Medical Federation, London, Athlone Press.
- 57 Hewitt, H.B. Survival curves and autoimmunity against cancer. *Brit. J. Radiol.* 37, 1964, 714.
- 58 Hewitt, H.B. Cellular radiosensitivity, tumour size, tumour growth rate. *Brit. J. Radiol.* 39, 1966, 78.
- 59 Hewitt, H.B. and Wilson, C.W. A survival curve for mammalian leukaemia cells irradiated *in vivo*. *Brit. J. Cancer* 13, 1959, 69.
- 60 Hewitt, H.B. and Wilson, C.W. The effect of tissue oxygen tension on the radiosensitivity of leukaemia cells irradiated *in situ* in the livers of leukaemic mice. *Brit. J. Cancer* 13, 1959, 675.
- 61 Hewitt, H.B. and Wilson, C.W. Survival curves for tumor cells irradiated *in vivo*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 95, art. 2, 1961, 818.
- 62 Hoffman, J.G., Goltz, H.L., Reinhard, M.C. and Warner, S.G. Quantitative determination of the growth of a transplantable mouse adenocarcinoma. *Cancer Res.* 3, 1943, 237.
- 63 Hornsey, S. and Silini, G. Studies on cell-survival of irradiated Ehrlich ascites tumour. II. Dose-effect curves for X-ray and neutron irradiations. *Int. J. Radiat. Biol.* 4, 1961, 135.
- 64 Ingall, J.R.F. A model for the study of experimental bone metastases. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 117, 1964, 819.
- 65 Jamieson, D. and Brenk, H.A.S. van den. Comparison of oxygen tensions

- in normal tissues and yoshida sarcoma of the rat breathing air or oxygen at 4 atmospheres. *Brit. J. Cancer* 17, 1963, 70.
- 66 Kaalen, J. Persoonlijke mededeling.
- 67 Kaliss, N. Immunological enhancement of tumor homografts in mice. *Cancer Res.* 18, 1958, 992.
- 68 Kallman, R.F. Persoonl. mededeling, 1965.
- 69 Kallman, R.F. and Tapley, N. duV. Radiation sensitivity and recovery patterns of spontaneous and isologously transplanted mouse tumors. *Acta Un. Int. Cancr.* 20, 1964, 1216.
- 70 Kampschmidt, R.F. and Upchurch, H.F. Effect of bacterial contamination of the tumor on tumor-host relationships. *Cancer Res.* 23, 1963, 756.
- 71 Kember, N.F. An *in vivo* cell survival system based on the recovery of rat growth cartilage from radiation injury. *Nature* 207, 1965, 501.
- 72 Kolstad, P. The development of the vascular bed in tumours as seen in squamous-cell carcinoma of the cervix uteri. *Brit. J. Radiol.* 38, 1965, 216.
- 73 Kormanio, M. and Niemi, M. The use of tetracycline fluorescence in experimental testicular pathology. *Med. exp.* 11, 1964, 383.
- 74 Laird, A.K. Dynamics of tumor growth. *Brit. J. Cancer.* 18, 1964, 490.
- 75 Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 96, 1949, 99.
- 76 Madden, R.E. and Burk, D. Production of viable single cell suspensions from solid tumors. *J. nat. Cancer Inst.* 27, 1961, 841.
- 77 Maruyama, Y. Variation in survival time of mice receiving X-irradiated murine lymphoma cells. *Brit. J. Radiol.* 39, 1966, 740.
- 78 Mayneord, W.V. On a law of growth of Jensen's rat sarcoma. *Amer. J. Cancer.* 16, 1932, 841.
- 79 McAlister, W.H. and Margulis, A.R. Angiography of malignant tumors in mice following irradiation. *Radiology* 81, 1963, 664.
- 80 McCulloch, E.A. and Till, J.E. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat. Res.* 13, 1960, 115.
- 81 McGavran, M.H., Ogura, J.H. and Powers, W.E. Small-dose preoperative radiation therapy. *Radiology* 83, 1964, 509.



- 82 Mendelsohn, M.L. Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C3H mouse. III. The growth fraction. *J. nat. Cancer Inst.* 28, 1962, 1015.
- 83 Mühlbock, O. Het Mamma tumor virus. *In: Het jaarboek van kankeronderzoek en kankerbestrijding in Nederland, deel 15, 1965.* Amsterdam, J.H. de Bussy. (in druk).
- 84 Old, L.J., Boyse, E.A., Clarke, D.A. and Caswell, E. Antigenic properties of chemically induced tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 101, art. 1., 1962, 80.
- 85 Powers, W.E. and Tolmach, L.J. Demonstration of an anoxic component in a mouse tumor-cell population by *in vivo* assay of survival following irradiation. *Radiology* 83, 1964, 328.
- 86 Prince, A.M., Littell, A.S. and Ginsberg, H.S. Methods for quantitative bioassay of Ehrlich ascites-tumor cells. *J. nat. Cancer Inst.* 18, 1957, 487.
- 87 Puck, T.T. and Marcus, P.I. Action of X-rays on mammalian cells. *J. exp. Med.* 103, 1956, 653.
- 88 Putten, L.M. van. Quantitative aspects of the storage of bone marrow cells for transplantation. *Europ. J. Cancer* 1, 1965, 15.
- 89 Putten, L.M. van and Kallman, R.F. Effect of pre-irradiation on the ratio of oxygenated and anoxic cells in a transplanted mouse tumor. *In: Third international congress of radiation research. Cortina d'Ampezzo, 1966, Abstract no. 910.*
- 90 Révész, L. Effect of lethally damaged tumor cells upon the development of admixed viable cells. *J. nat. Cancer Inst.* 20, 1958, 1157.
- 91 Ribbert, H. Ueber das Gefäßsystem und die Heilbarkeit der Geschwülste. *Dtsch. med. Wschr.* 30, 1904, 101.
- 92 Robinson, D.M. 'Cell killing' in radiobiology. *Nature* 208, 1965, 500.
- 93 Scott, O.C.A. Some observations on the use of transplanted tumors in radiobiological research. *Radiat. Res.* 14, 1961, 643.
- 94 Silver, I.A. and Cater, D.B. Radiotherapy and chemotherapy for domestic animals. II. Treatment of malignant tumours in dogs and cats. *Acta radiol. (Stockh.)* 2, 1964, 457.
- 95 Sinclair, W.K. X-ray-induced heritable damage (small-colony information) in cultured mammalian cells. *Radiat. Res.* 21, 1964, 584.

- 96 Smeulers, J. Tumorgroei op de chorio-allantois van het kippeei. Ned. T. Geneesk. 110, 1966, 508.
- 97 Smith, L.H. and Vos, O. Sensitivity and protection of mouse bone-marrow cells X-irradiated in vitro. Int. J. Radiat. Biol. 5, 1962, 461.
- 98 Smith, L.H. and Vos, O. Radiation sensitivity of mouse lymph node cells relative to their proliferative capacity in vivo. Radiat. Res. 19, 1963, 485.
- 99 Snell, G.D. A cytosieve permitting sterile preparation of suspensions of tumor cells for transplantation. J. nat. Cancer Inst. 13, 1953, 1511.
- 100 Spear, F.G. and Loutit, J.T. Biological effects of radiation. External irradiation. In: British practice in radiotherapy, 1955, 48, London, Butterworth & Co.
- 101 Starling, E.H. In: Principles of human physiology. 1949, 687, London, J. & A. Churchill, Ltd.
- 102 Stoner, H.B. The use of the oxygen cathode in pathological investigations. Brit. J. exp. Path. 44, 1963, 384.
- 103 Suit, H., Lindberg, R. and Fletcher, G.H. Prognostic significance of extent of tumor regression at completion of radiation therapy. Radiology, 84, 1965, 1100.
- 104 Suit, H., Schlachter, L. and Andrews, J.R. 'Oxygen effect' and tumor size as related to response of C3H/Ba adenocarcinoma to local X-irradiation. J. nat. Cancer Inst. 24, 1960, 1271.
- 105 Suit, H.D. and Shalek, R.J. Response of anoxic C3H mouse mammary carcinoma isografts (1-25 mm<sup>3</sup>) to X-irradiation. J. nat. Cancer Inst. 31, 1963, 479.
- 106 Suit, H.D. and Shalek, R.J. Response of spontaneous mammary carcinoma of the C3H mouse to X-irradiation given under conditions of local tissue anoxia. J. nat. Cancer Inst. 31, 1963, 497.
- 107 Suit, H.D., Shalek, R.J. and Wette, R. Radiation response of C3H mouse mammary carcinoma evaluated in terms of cellular radiation sensitivity. In: Cellular radiation biology, 1965, 514, Baltimore, The Williams & Wilkins Company.
- 108 Thomlinson, R.H. An experimental method for comparing treatments of intact malignant tumours in animals and its application to the use of oxygen in radiotherapy. Brit. J. Cancer 14, 1960, 555.

- 109 Thomlinson, R.H. The oxygen effect in mammals. In: Fundamental aspects of radiosensitivity. Symposium, June 1961, Brookhaven National Laboratory, Upton, 204.
- 110 Thomlinson, R.H. and Gray, L.H. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Brit. J. Cancer*. 9, 1955, 539.
- 111 Till, J.E. and McCulloch, E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 14, 1961, 213.
- 112 Urbach, F. and Graham, J.H. Anatomy of human skin tumour capillaries. *Nature*, 194, 1962, 652.
- 113 Vofkori, J. Method for the measurement of the size of transplantable tumours of rats. *Neoplasma*, 10, 1963, 187.
- 114 Wallace, A.C. and Hollenberg, N.K. The transplantability of tumours by intravenous and intralymphatic routes. *Brit. J. Cancer* 19, 1965, 338.
- 115 Warburg, O. In: *Über den Stoffwechsel der Tumoren*. Berlin, Verlag von Julius Springer, 1926, 128.
- 116 Welin, S., Youker, J. and Spratt, J.S. The rates and patterns of growth of 375 tumors of the large intestine and rectum observed serially by double contrast enema study (Malmö technique). *Amer. J. Roentgenol.* 90, 1963, 673.
- 117 Whitmore, G.F. and Till, J.E. Quantitation of cellular radiobiological responses. *Ann. Rev. nuclear Sci.* 14, 1964, 347.
- 118 Wilson, C.W. Possible implications of recent radiobiological observations for tumour-dose-fractionation schedules. *Radiology*, 77, 1961, 940.
- 119 Withers, H.R. Dose response of epithelial cells of skin. *Brit. J. Radiol.* 39, 1966, 159.
- 120 Young, J.S., Lumsden, C.E. and Stalker, A.L. The significance of the 'Tissue pressure' of normal testicular and of neoplastic (Brown pearce carcinoma) tissue in the rabbit. *J. Path. Bact.* 62, 1960, 313.

Druk: Augustin en Schoonman N.V.  
4 kleurendruk: Drukkerij Elkerbout.  
Ontwerp omslag: Nono Reinhold.