

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor Prof.Dr.med.habil.Jürgen Dunst)



# Untersuchungen zur Radiosensitivität mit dem Comet-Assay

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt der  
Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von *Steffi Ulrike Pigorsch, geb.Burghardt*  
geboren am 04.Juli 1972 in Lutherstadt Eisleben

## **Gutachter:**

1. Prof. Dr. J.Dunst (MLU Halle-Wittenberg)
2. PD Dr. H.Taubert (MLU Halle-Wittenberg)
3. PD Dr. H.Schmidberger (Universität Göttingen)

Halle(Saale), dem 2. November 2001

**urn:nbn:de:gbv:3-000002621**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002621>]

## Referat

Seit der Einführung der Strahlentherapie in die Tumorbehandlung gibt es Bestrebungen, mögliche radiogen induzierbare Nebenwirkungen prätherapeutisch abzuschätzen. Innerhalb der letzten 20 Jahre wurden verschiedene Testverfahren entwickelt, um die Strahlenempfindlichkeit von Tumor- und Normalgeweben zu beurteilen. Im Rahmen der Arbeit sollte untersucht werden, ob die Einzelzell-Gelelektrophorese (*Comet-Assay*) in der Lage ist, Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit verschiedener Zellarten zu detektieren. Dabei war es von besonderem Interesse, wie Lymphozyten von Patienten mit stark akuten und chronischen Nebenwirkungen auf In-vitro-Bestrahlung reagierten. Die Strahlenempfindlichkeit von Leukozyten unter In-vivo-Bestrahlungsbedingungen bei nahezu homogener Dosisverteilung im Körper konnte bei Ganzkörperbestrahlungen untersucht werden. Zusätzlich wurde anhand der Reparaturkurven das Verhalten der Leukozytenpopulationen unter Ganzkörperbestrahlungsbedingungen an drei Patienten untersucht, wobei das Reparaturverhalten der Leukozyten in-vivo und in-vitro miteinander verglichen werden konnte. Außerdem wurden mit dem *Comet-Assay* drei Weichteilsarkomzelllinien, einer relativ strahlenresistenten Tumorart, charakterisiert. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den *Comet-Assay*-Experimenten und der Daten aus dem Koloniebildungstest zeigten deren Vereinbarkeit. Desweiteren ließen sich unterschiedliche Strahlenempfindlichkeiten an Weichteilsarkomzellkulturen nachweisen.

## Bibliographische Beschreibung

Pigorsch, Steffi Ulrike : Untersuchungen zur Radiosensitivität mit dem Comet-Assay.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 72 Seiten, 2001

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	<b>Einleitung</b> . . . . . 1
2	<b>Material und Methoden</b> . . . . . 4
2.1	Die Einzelzell-Gelelektrophorese . . . . . 4
2.1.1	Protokoll . . . . . 8
2.2	Weichteilsarkomzellkulturen . . . . . 11
2.2.1	Primärkulturen . . . . . 11
2.2.2	Zellkulturen . . . . . 12
2.2.3	Veränderungen im Comet-Assay-Protokoll . . . . . 15
2.3	Patientengruppe mit Nebenwirkungen . . . . . 16
2.4	Untersuchungen während Ganzkörperbestrahlungen . . . . . 19
3	<b>Ergebnisse</b> . . . . . 21
3.1	Sarkomzellkulturen . . . . . 21
3.1.1	Dosis-Wirkungs-Beziehungen . . . . . 21
3.1.2	Koffeineinfluß auf den DNS-Schaden . . . . . 23
3.1.3	Reparaturuntersuchungen . . . . . 24
3.2	Patienten mit akuten und späten radiogen bedingten Nebenwirkungen . . . . . 27
3.2.1	Dosis-Wirkungs-Beziehungen . . . . . 27
3.2.2	Reparaturuntersuchungen . . . . . 30
3.2.3	Unterschiede in der Kometenstruktur . . . . . 31
3.3	Untersuchungen während Ganzkörperbestrahlungen . . . . . 33
3.3.1	Blutbildveränderungen . . . . . 33
3.3.2	DNS-Basalschaden . . . . . 35
3.3.3	Dosis-Wirkungs-Beziehungen . . . . . 36
3.3.4	Reparaturuntersuchungen . . . . . 38

4	<b>Diskussion</b> . . . . .	42
4.1	Sarkomzellen . . . . .	42
4.1.1	Vergleich der beiden Comet-Assay-Protokolle . . . . .	42
4.1.2	Zellzyklusabhängigkeit und Einfluß der DNS-Struktur . . . . .	44
4.1.3	Einfluß des p53-Status auf die Strahlenempfindlichkeit . . . . .	46
4.1.4	Reparaturuntersuchungen . . . . .	47
4.1.5	Koffeineinfluß auf den DNS-Schaden . . . . .	49
4.2	Patienten mit akuten und späten radiogen bedingten Nebenwirkungen . . . . .	50
4.2.1	Dosis-Wirkungs-Untersuchungen . . . . .	51
4.2.2	Reparaturuntersuchungen . . . . .	52
4.3	Untersuchungen während Ganzkörperbestrahlung . . . . .	54
4.3.1	Blutbildveränderungen . . . . .	54
4.3.2	DNS-Basalschädigung vor jeder Bestrahlung . . . . .	56
4.3.3	In-vitro-Dosis-Wirkungs-Beziehungen . . . . .	57
4.3.4	Reparaturuntersuchungen . . . . .	57
5	<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	59
	<b>Literaturverzeichnis</b> . . . . .	62
	<b>Thesen</b> . . . . .	70
	<b>Lebenslauf</b> . . . . .	
	<b>Selbständigkeitserklärung</b> . . . . .	
	<b>Publikationsliste</b> . . . . .	
	<b>Erklärung über frühere Promotionsversuche</b> . . . . .	
	<b>Danksagung</b> . . . . .	

# Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATCC	American Tissue Culture Collection
BET	Brusterhaltende Therapie
BWK	Brustwirbelkörper
CFGE	Constant Field Gel Electrophoresis (Konstantfeld-Gelelektrophorese)
CTC	Common Toxicity Criteria
FISH	Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung
FKS	Fötales Kälberserum
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSM Braunschweig	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig
HWK	Halswirbelkörper
kb	Kilobasen
LMP-Agarose	Low Melting Point Agarose
MLU	Martin-Luther-Universität
mRNS	”messenger” Ribonukleinsäure (”Boten”-Ribonukleinsäure)
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis (Pulsfeld-Gelelektrophorese)
RD	Residualschaden
RT	Radiotherapie
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis (Einzelzell-Gelelektrophorese)
TBI	Total Body Irradiation (Ganzkörperbestrahlung)
TM	Tail Moment (Schweif-Moment)
TMI	Total Marrow Irradiation (Ganzknochenmarkbestrahlung)
WTS	Weichteilsarkom

# Kapitel 1

## Einleitung

1895 entdeckte Wilhelm Conrad Röntgen die nach ihm benannte Strahlung. Kurze Zeit später fanden die ersten Experimente zur Charakterisierung radioaktiver Stoffe durch Marie und Pierre Curie sowie Henri Becquerel statt. Unmittelbar nach den Entdeckungen wurde nach Anwendungen in der Medizin geforscht. Bereits 1896 wurde die erste therapeutische Bestrahlung durchgeführt [67]. Auf Grund von aufgetretenen Strahlenschäden (Rötung und Geschwürsbildung) an der Haut von Experimentatoren, Chirurgen und Patienten kam man auf die Idee, Röntgenstrahlung zur Behandlung von Tumoren einzusetzen. Zusammenhänge zwischen der radioaktiven Strahlung und den dadurch ausgelösten zellulären Effekten waren weitgehend unbekannt. Die angewendete Gesamtdosis wurde über den Rötungsgrad der Haut bestimmt. Die Kenntnisse über die physikalische Dosimetrie waren noch sehr ungenau.

Alle Zellen eines Organismus sind schädlichen, natürlichen Einflüssen ausgesetzt. Unter zusätzlicher Strahleneinwirkung treten Störungen des normalen Zellstoffwechsels als auch Veränderungen des Erbgutes - der DNS - auf, welche zum Zelltod beziehungsweise bei subletalen Strahlenschäden zu Mutationen der Erbinformation führen können. In Tumorzellen wie in Zellen des Normalgewebes existieren Mechanismen, welche es ermöglichen, ca. 99,9% der entstanden Schäden mittels zelleigener Enzyme zu reparieren [4].

Mit Hilfe der modernen Strahlentherapie kann man Tumoren sehr präzise bestrahlen und gleichzeitig das umliegende Gewebe schonen. Dennoch gibt es immer wieder Patienten, die mit starken Nebenwirkungen der Haut oder der inneren Organe reagieren.

Maligne Zellen wie Zellen des Normalgewebes verfügen über unterschiedliche

Strahlenempfindlichkeit. Sowohl äußere als auch innere Faktoren bestimmen die Strahlenempfindlichkeit eines Individuums. Die Gesamtheit der "inneren Faktoren" wird auch als "intrinsische Strahlenempfindlichkeit" bezeichnet. Diese ist seit ca. 20 Jahren intensiver Forschungsgegenstand der Strahlenbiologie.

Wenn es gelänge, einen prädiktiven, zeit- und kostengünstigen Test zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit zu entwickeln, könnte man eine individuelle Dosisverordnung mit Anpassung an Tumor- und Normalgeweben vornehmen. Hierzu wurden in den letzten Jahren verschiedene Testverfahren entwickelt und vorgeschlagen. Allen gemeinsam ist die Beurteilung des DNS-Schadensausmaßes nach "Noxen" einwirkung. Zur Anwendung kommen der Koloniebildungstest, die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), die Pulsfeld- (PFGE), die Konstantfeld- (CFGE) und die Einzelzell-Gelelektrophorese (SCGE), auch *Comet-Assay* genannt.

Beim Koloniebildungstest werden Zellen nach Bestrahlung dünn in Kulturflaschen ausgesät. Ihre Proliferationsfähigkeit wird nach 2 Wochen beurteilt. PFGE und CFGE sind Verfahren, die die entstandene DNS-Fragmentgröße nach Strahleneinwirkung auf eine Zellpopulation bestimmen. Dafür muß das Erbgut in einem relativ aufwendigen Prozeß aus den Zellen extrahiert werden. Die FISH-Technik ist eine Methode, mittels der an Zwischenphase-Chromosomen morphologische Veränderungen nachgewiesen werden. Über die Anfärbung bestimmter Chromosomen (z.B. #1, #2, #4) oder im 24-Farb-FISH können so typische Translokationen oder DNS-Brüche dargestellt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Zellarten wurden mit Hilfe des *Comet-Assays* auf ihre Strahlenempfindlichkeit und ihr Reparaturvermögen hin untersucht. 1984 beschrieben Östling und Johanson [50] diese Technik zur Beurteilung des DNS-Schadens auf der Basis einzelner Zellen. Dabei werden Zellen in Agarose auf Objektträgern eingebettet, bestrahlt und lysiert dann einem elektrischen Feld ausgesetzt und nach Anfärbung am Mikroskop ausgewertet. Durch die Wanderung negativ geladener DNS-Stücke im Gel entstehen Formationen, die an Kometen erinnern und damit diesem Verfahren den Namen gaben. Der "Komet" kann Aufschluß über den induzierten DNS-Schaden geben. Im Kopf befindet sich vermutlich das am wenigsten geschädigte Erbgut, während im Schweif DNS-Bruchstücke und aufgewundene DNS-Schleifen liegen. Es gibt ernsthafte Hinweise dafür, daß sich die Reparaturfähigkeit von Zellen mit dem *Comet-Assay* über die Abnahme der Fluoreszenzintensität im Schweif ermitteln läßt [23, 50, 61].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit es mit dieser Methode möglich ist, Tumorzellkulturen und humane Lymphozyten hinsichtlich des DNS-Schadens und der Reparaturfähigkeit zu charakterisieren. Im Speziellen wurden hier Weichteilsarkomzellkulturen und Lymphozyten untersucht. Drei selbstetablierte Weichteilsarkomzellkulturen, die bereits strahlenbiologisch untersucht waren, sollten bezüglich ihrer Strahlenempfindlichkeit mit dem *Comet-Assay* charakterisiert werden. Außerdem bestand die Frage, ob durch die Inkubation mit Koffein eine Radiosensibilisierung ausgelöst und nachgewiesen werden kann.

In Untersuchungen an Patienten sollte geklärt werden, ob Lymphozyten aus Vollblut als Testsystem bezüglich der individuellen Strahlenempfindlichkeit verwendet werden können. Verschiedene Publikationen belegen den Wert von humanen Lymphozyten als Testsystem für die Strahlenempfindlichkeit eines Individuums [20, 66]. Im Gegensatz zu den oben genannten Effekten von In-vitro-Bestrahlung sollte hier weiterhin in-vivo unter den Bedingungen einer Ganzkörperbestrahlung das Verhalten der Leukozytenpopulationen beurteilt werden. Dabei sollte untersucht werden, ob in-vivo und in-vitro vergleichbare Reaktionen an Lymphozyten auf eine Ganzkörperbestrahlung mit dem alkalischen *Comet-Assay* nachweisbar sind.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Die Einzelzell-Gelelektrophorese

Das *Comet-Assay* detektiert Diskontinuitäten innerhalb von DNS-Strängen [2]. Die kleinste DNS-Fragmentgröße, die sowohl mit dem alkalischen als auch dem neutralen *Comet-Assay* erkannt werden kann, beträgt 40 kb [6]. Mit diesem Test kann das Verhalten der Nukleotid-Exzisionsreparatur nach Bestrahlung an verschiedenen Zellarten untersucht werden [66]. 1984 wurde die Einzelzell-Gelelektrophorese erstmalig von Östling und Johanson beschrieben [50]. In den folgenden Jahren wurde die Technik von Singh et al. in ihrer Anwendung auf Fibroblasten erweitert [62]. Die negativ geladenen DNS-Bruchstücke wandern nach Anlegen eines elektrischen Feldes in Anodenrichtung. Zur Detektion eines Schadens mußten die Zellen in den ersten Experimenten mit mindestens 0,5 Gy bestrahlt werden. Mit einem modifiziertem Protokoll konnten Singh et al. DNS-Schäden in Lymphozyten nach Bestrahlung mit Dosen, die sich nur um 50 mGy unterschieden, messen [63]. Die Residualschäden wurden nach Bestrahlung mit 2 Gy nach 60 Minuten Inkubation bestimmt. Bereits in den ersten Experimenten beobachtete man, daß nach einer Reparaturzeit von 20 Minuten eine deutliche Zunahme des Schadens zu messen war. Dieses Phänomen im *Comet-Assay* wird als Effekt der Nukleotid-Exzisionsreparatur gedeutet [51].

Nach dem Einbetten von Zellen in Agarosegelen bildet sich ein kugelförmiger Hohlraum um die Zellen. Im Laufe des Lysevorganges wird die Zelle mit den anhaftenden Proteinen zerstört. In der Vertiefung bleibt die DNS zurück. Nach Einwirkung der elektrischen Kräfte wandern DNS-Bruchstücke aus dem Kern und es bildet sich der Komet mit dem Schweif in Richtung der Anode aus [50]. Die DNS-Wanderungsfähigkeit hängt von der Bestrahlungsdosis, von der DNS-Fragmentgröße,

von der Dauer des Entwindens und von der Elektrophoresezeit ab [68]. Mit diesem Testverfahren ist es möglich, die individuelle Reparaturkapazität von Einzelzellen zu bestimmen. Das Hauptproblem aller DNS-Schadenstests besteht darin, daß zwar die Wiederverknüpfung ("Rejoining") von DNS-Fragmenten gemessen werden kann, dadurch aber keine Aussagen über deren funktionelle Integrität getroffen werden. Außer der Wiederverknüpfung treten noch andere Effekte auf. Denaturierungs- (Lyse) und Renaturierungsvorgänge (Neutralisation) beeinflussen entscheidend die DNS-Struktur. Durch Entknäuelung (Aufhebung der Tertiärstruktur) und Verhaken freier DNS-Enden ("Entangling" mit der Folge von nichthomologen "annealing") kann es zum Vortäuschen besserer oder schlechterer Reparaturergebnisse kommen [46].

Die Einzelzell-Gelelektrophorese (*Comet-Assay*) kann bei Tests für DNS-Schäden eine Art Vorposten zum groben Herausfiltern von Unterschieden im Reparaturverhalten von Zellen einnehmen. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß man einzelne Zellen, welche bereits eine starke DNS-Degradation aufweisen, von der Auswertung ausnehmen kann, das heißt, apoptotische und nekrotische Zellen können mit diesem Test erkannt werden. Damit werden Subpopulationen klar voneinander trennbar [49, 61]. Durch die vorsichtige Präparation von Zellen kann man davon ausgehen, daß die DNS auch nach dem Lysevorgang weiterhin hochmolekular vorliegt und sich damit kaum von der DNS in vitalen Zellen unterscheidet. Nach dem Denaturierungsvorgang existieren immer noch Replikationscluster.

Mit dem hier verwendeten *Comet-Assay*, welcher unter alkalischen Milieubedingungen durchgeführt wurde, betrachtet man vor allem Einzelstrangbrüche. Diese können direkt durch Strahlungseinwirkung oder auf indirektem Weg entstehen. DNS-Doppelstrangbrüche degradieren durch den Einfluß alkalischer Lösungen zu DNS-Einzelstrangbrüchen. Zusätzliche Diskontinuitäten der DNS resultieren aus der Induktion alkalilabiler Stellen. Betrachtet man die gemessenen Parameter des *Comet-Assay*, so kann man nicht auf die Entstehungsursache schließen [35]. Im alkalischen Milieu werden die RNS und Proteine denaturiert. Damit können Interferenzen bei der Anfärbung mit Ethidiumbromid zwischen DNS und RNS minimiert werden [61]. DNS-Strangbrüche führen zu einer Relaxation der Tertiärstruktur der DNS im betroffenen Gebiet. Dadurch wird ein Auseinanderziehen des DNS-Knäuels überhaupt erst möglich. Desweiteren wird die Schweiflänge eines Kometen hauptsächlich über die Elektrophoresebedingungen und nicht durch die Fragmentgröße begrenzt [23]. Mit steigender Anzahl der freien DNS-Fragmente wandern im-

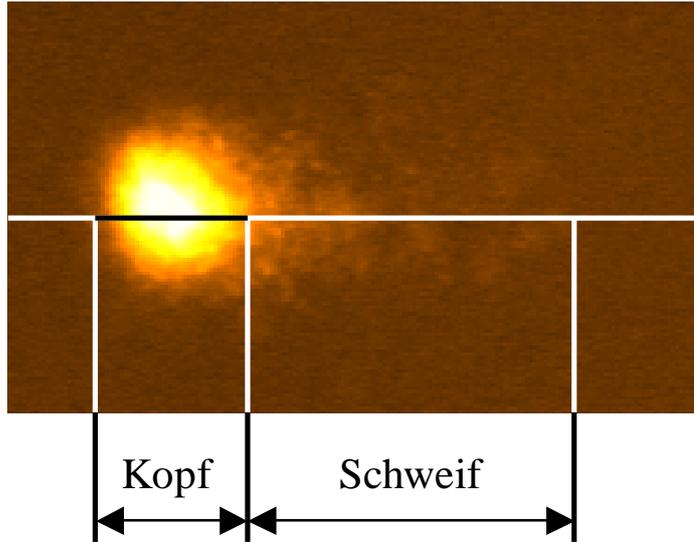


Abbildung 2.1: Komet zur Erläuterung der Struktur

mer mehr Bruchstücke während der Elektrophorese in den Schweif ein. In den Extremfällen von DNS-Fragmentation und Degradation (Apoptose und Nekrose) sind Kopf und Schweif deutlich separiert. Viele Arbeitsgruppen nutzen den Parameter "Tail moment" zur Auswertung.

$$\text{Tail moment (TM)} = \text{Schweiflänge} \times \text{DNS im Schweif} . \quad (2.1)$$

Die absolute Größe der Schweiflänge kann durch sehr viele Parameter beeinflusst werden. Aus diesem Grund basieren die hier gezeigten Daten auf dem Fluoreszenzanteil im Schweif zum Zeitpunkt  $t$  bei der Dosis  $D$  ( $\text{DNS im Schweif}(t, D)$ ) im Verhältnis zum Kopf ( $\text{DNS im Kopf}(t, D)$ ). Diese relativen Parameter sind unabhängig von der Schweiflänge, und damit der Fragmentgröße, sowie vom Gesamt-DNS-Gehalt einer Zelle [46]. Es gilt dann

$$1 = \text{DNS im Schweif}(t, D) + \text{DNS im Kopf}(t, D) . \quad (2.2)$$

Durch die Bestimmung der Gesamtkometen-Fluoreszenzintensität ist es möglich, die Position im Zellzyklus zu bestimmen. Die Position einer Zelle im Zellzyklus läßt sich anhand der angeführten Parameter erkennen [16]. Im alkalischen *Comet-Assay* können Replikationsbezirke als DNS-Strangbrüche fehlgedeutet werden. Die Anzahl "detektierter" Strangbrüche nimmt zu [23]. Olive et al. konnten in Untersuchungen zeigen, daß unbestrahlte Zellen in der S-Phase ein größeres Tail Moment aufweisen als Zellen aus anderen Zellzyklusphasen [45]. Aus diesem Grund beeinflusst die

Zellzyklusposition das Ausmaß der DNS-Schädigung.

Zum Verständnis der verwendeten Schadensbegriffe werden diese im folgenden kurz definiert.

Unter dem **DNS-Basalschaden** oder der **DNS-Basisschädigung** (*DNS im Schweif*  $(t_0, 0)$ ) versteht man die Schadensmenge, die ohne zusätzliche Einwirkung einer zell- oder DNS-schädigenden Substanz bereits vorhanden ist. In diesen Wert fließen präparationstechnische Artefakte mit ein. Das Basalschadensausmaß umfaßt ebenso die natürliche Strahleneinwirkung wie auch Chemotherapieeffekte, bei bereits vorbehandelten Patienten. Der Schaden, welcher unmittelbar nach Einwirkung einer Bestrahlung auf eine Zelle zur Zeit  $t_0$  meßbar ist, wird als **Initialschaden** (*DNS im Schweif*  $(t_0, D)$ ) bezeichnet. Die Abnahme des sog. Initialschadens über einen bestimmten Zeitraum wird als das Vermögen zur Reparatur - als **Reparaturkapazität** - bezeichnet. Aus dem Verhalten des **Schadens** (*DNS im Schweif*  $(t, D)$ ) zur Zeit  $t$  kann man Aussagen zur Reparaturgeschwindigkeit, zur Reparaturkapazität und zur Vollständigkeit dieses Prozesses treffen. Mit dem *Comet-Assay* ist es aber nicht möglich, die Exaktheit des abgelaufenen Reparaturvorganges zu bestimmen. Ebenso ermöglicht diese Technik bei Untersuchungen der Zellen nach Präparation auf Objektträger nur Beurteilungen im Verlauf von maximal 120 Minuten. Darüberhinaus treten zusätzliche Störfaktoren an DNS-Schäden aufgrund sich verschlechternder Ernährungsbedingungen der Zellen im Gel auf [2]. Reparaturprozesse unterliegen einer exponentiellen Kinetik. Die **Reparaturhalbwertszeit**  $\tau$  kann aus der Reparaturkurve berechnet werden. Sie gibt an, in welchem Zeitraum der Initialschaden um 50% vermindert wird.

Der **Residualschaden** (*RD*  $(t, D)$ ) entspricht der geschädigten DNS-Menge, die nach definierter Reparaturzeit  $t - t_0$  im Verhältnis zum Basal- und Initialschaden verbleibt. In den so berechneten Residualschaden fließen nicht reparierte Läsionen, Inzisionsstücke während des Reparaturprozesses sowie neue Brüche, die in Folge von DNS-Degradation bei Apoptose und Nekrose entstehen, ein. Der Residualschaden zur Zeit  $t$  wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$RD(t, D) = \frac{\text{DNS im Schweif}(t, D) - \text{DNS im Schweif}(t_0, 0)}{\text{DNS im Schweif}(t_0, D) - \text{DNS im Schweif}(t_0, 0)} \quad (2.3)$$

Aus Untersuchungen von Zellkulturen und Beobachtungen der Auswirkung der Bestrahlung auf Tumor- und Normalgeweben wurde empirisch das linear-quadratische Modell abgeleitet. Danach überleben nur subletal-geschädigte Zellen während letale

Zellen für das Überleben entfallen. Der Überlebensanteil der Zellpopulation  $S$  (oder äquivalent die Abnahme der Schweiffluoreszenzintensität) kann durch

$$S \sim \exp [ - (\alpha + \beta D) D ] \quad (2.4)$$

angenähert werden, wobei  $\alpha$  den letalen und  $\beta$  den subletalen Schaden charakterisiert. Aus der Breite des Schulterbereiches ( $\beta$ -Komponente) kann man auf die Erholungsfähigkeit der Population schließen [60].

### 2.1.1 Protokoll

Die Zellpräparationen liefen nach verschiedenen Protokollen ab, wobei alle Experimente dreifach durchgeführt wurden. Gemeinsam ist allen Verfahren der Probenauftrag in 0,5% LMP-Agarose, welche mit RPMI 1640 und 10% fötalem Kälberserum bereitet wurde. Als Grundsicht zur verbesserten Adhäsion diente 1% Agarose in PBS. Diese Schicht wurde nach Gelbildung wieder abgetragen. Auf die getrockneten Objektträger ("fully frosted slides") wurde 300  $\mu$ l 0,6% PBS-Agarose als unmittelbare Grundsicht aufgetragen. Nach Resuspension der jeweiligen Zellart in 85  $\mu$ l 0,5% LMP-Agarose wurde die mittlere Probenschicht präpariert. Für die Lymphozyten-Untersuchungen wurde noch eine Deckschicht mit 85  $\mu$ l 0,5% LMP-Agarose aufgebracht [50, 61]. Nach Präparation der Zellen auf Objektträger erfolgte

Firma	Gerät
Biotec Fischer	Elektrophoresegerät Phero Stab 550 Elektrophoresekammer
Labcraft, Houston, TX	Objektträger "fully frosted slides"
Labcraft, Houston, TX	Objektträger, Deckgläschen
Zeiss (Jena)	Fluoreszenzmikroskop Axioskop
Memmert	Brutschrank
Hettich	Zentrifuge
Eppendorf	2 ml Röhrchen, 1 ml Röhrchen
Saarstedt	15 ml Röhrchen
Corning	15 ml Röhrchen
Philips	Röntgentiefentherapieanlage RT 250

Tabelle 2.1: *Aufführung aller verwendeten Geräte und Hilfsmittel*

die Bestrahlung an einem Röntgentiefentherapiegerät Phillips RT 250 mit einer Dosisleistung von 208,3 cGy/min mit 0,5 mm Cu und 200 kV mit einer Tubusgröße von 15x20 cm<sup>2</sup>. Für die Dauer der Bestrahlung wurden die eisgekühlten Objektträger auf 4°C gekühlte Piacrylplatten gelegt. Die weiteren Vorgänge liefen unter Eiskühlung ab, um Reparaturvorgänge zu minimieren. Alle verwendeten Geräte und Hilfsmittel sind in Tab.2.1 aufgeführt.

Dosis (Gy)	0,25	0,5	0,7	1	2	4	8	10
Zeit (min)	0,12	0,24	0,34	0,48	0,96	1,92	3,84	4,82

Tabelle 2.2: *Bestrahlungszeiten für die Objektträger-Methode bezogen auf die Tubusgröße 15x20 cm<sup>2</sup>*

Dosis (Gy)	0,5	1	2	4	8
Zeit (min)	0,28	0,55	1,10	2,21	4,42

Tabelle 2.3: *Bestrahlungszeiten für die Eppendorf-Gefäß-Methode bezogen auf die Tubusgröße 15x20 cm<sup>2</sup>*

Für die Bestrahlung von Tumorzellen wurde nach zwei verschiedenen Protokollen verfahren. Einerseits verwendete man die oben beschriebene Objektträger-Methode (Tab.2.2) im Folgenden als Variante II bezeichnet, andererseits bestrahlte man Tumorzellen in Eppendorf-Gefäßen (Variante I, Tab.2.3). Das Eiswasserbad diente dazu, die Röhrchen während der Bestrahlung zu kühlen. Auf Grund der veränderten Bestrahlungsgeometrie mußten die Bestrahlungszeiten entsprechend berechnet werden.

Zur Lysierung der Zellen wurden 250 ml Lyselösung aus einer Stammlösung hergestellt. Die Hyperosmolarität führt zum Zellhydrops, außerdem werden intrazelluläre Proteine denaturiert. Für jeden Ansatz wurden die Lysegebrauchslösung und der Elektrophoresepuffer frisch bereitet.

### **Lysestammlösung**

2,5 M NaCl

100 mM EDTA

10 mM Tris(hydroxymethyl-)aminoethan

1 % Natrium-Lauroylsarcosinat

mit 10 N NaOH auf pH 10 einstellen

Aufbewahrung bei Raumtemperatur

### **Frische Gebrauchslösung**

2,5 ml Triton-X 100

25 ml DMSO

ad 250 ml Lysestammlösung

Aufbewahrung bei 4°C

### **Elektrophorese-Puffer**

58 ml 10 N NaOH

10 ml 200 mM EDTA

ad 2000 ml Aqua dest.

pH-Wert sollte 13 betragen

Aufbewahrung bei 4°C

### **Neutralisationslösung**

0,4 M Tris(hydroxymethyl-)aminoethan

ad 1000 ml Aqua dest.

mit 10 M HCl auf pH 7,5 einstellen

Während des Entwindens (1 Stunde) und der Elektrophorese (30 Minuten) wurde die Elektrophoresekammer ständig gekühlt. Nach Beendigung dieser Vorgänge neutralisierte man die Gele über Nacht bei 4°C. Mit Ethidiumbromid (Sigma) wurde die DNS angefärbt. Dazu wurde die Gebrauchslösung frisch aus 20  $\mu$ l Ethidiumbromid ad 10 ml H<sub>2</sub>O bereitet. 85  $\mu$ l dieser Farblösung wurden pro Objektträger aufgetragen. Nach mindestens 10 Minuten Inkubation im abgedunkelten Raum konnten die Objektträger ausgewertet werden. Ethidiumbromid als Farbstoff bindet hauptsächlich an Doppelstrang-DNS. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität des Kometenkopfes im Vergleich zum Ausgangswert (DNS-Basalschaden) ist das Maß für den Grad der Einzelstrangbruchausprägung. Eine nach abgelaufener Reparaturzeit gemessene Zunahme der Fluoreszenzintensität im Kopf des Kometen entspricht einem abgelaufenen Reparaturprozeß.

Die Elektrophorese wurde in einer Submarine-Kammer (Fischer biotec) durchgeführt. Die DNS wurde bei diesem Vorgang einem elektrischen Feld von 0.8 V/cm, d.h. 25 V und 300 mA für 30 Minuten im alkalischen Milieu (pH 13) ausgesetzt. Durch Zugabe des Elektrophoresepuffers regulierte man die Spannungs- und die Stromstärke-Einstellung.

Nach Ethidiumbromidanfärbung der DNS konnten die Objektträger unter einem Auflichtfluoreszenzmikroskop (Axioskop, Fa. Zeiss) betrachtet werden. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampfampe (HBO 50, Fa. OSRAM) mit einem Erregungsfilter von 510-560 nm. Die Wellenlänge des Sperrfilters betrug 590 nm. Über eine CCD-Kamera (Pulnix<sup>TM</sup>- 765E, Kinetic Imaging, Ltd.) wird das Fluoreszenzsignal an einen Personalcomputer weitergeleitet und mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware KOMET Analysis 3.0 (Kinetic Imaging, Ltd.) ausgewertet. Zur Analyse der Daten wurde hauptsächlich der Parameter *DNS im Schweif* (entspricht der Fluoreszenzintensität im Schweif) herangezogen. Pro Objektträger wurden 25 Zellen ausgewertet. Jeweils zwei Objektträger wurden mit der selben Dosis bestrahlt. Damit stellt die Schadensangabe pro Dosis den Mittelwert über 50 Zellen dar.

## 2.2 Weichteilsarkomzellkulturen

### 2.2.1 Primärkulturen

Die Weichteilsarkomzelllinien US 8-93 und LMS 6-93 sind im Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle selbstetablierte Zelllinien, welche aus Operationsgut gewonnen wurden. Die Zelllinie SAOS-2 (ursprünglich aus der ATCC) ist eine kommerziell erworbene Linie aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ Braunschweig) (Tab.2.4). Alle drei Linien sind im

Zelllinie	Histologie	p53-Status	Mutationstyp	Literatur
US 8-93	undifferenziert	mt/wt	non-sense	Taubert et al. 1997 [64]
LMS 6-93	Leiomyosarkom	mt/wt	1-bp-Insertion	Meye et al. 1998 [36]
SAOS-2	Osteosarkom	-/-	Deletionen	Masuda et al. 1987 [34]

Tabelle 2.4: Charakterisierung der drei untersuchten Weichteilsarkomzellkulturen

Institut für Pathologie der MLU Halle molekularbiologisch charakterisiert. Die Untersuchungen zur Strahlenempfindlichkeit mit dem *Comet-Assay* wurden zwischen der 112.-116.Passage für US 8-93, zwischen der 85.-90.Passage für LMS 6-93 und zwischen der 14.-20.Passage für SAOS-2 durchgeführt.

Die Linie US 8-93 stammt von einem undifferenzierten Sarkom am Rumpf eines 40 Jahre alten Patienten. Dieser wurde mit weite Tumorexzision und adjuvanter Radiotherapie behandelt. Im Exon 4 (Kodon 91) des Tumorsuppressorgens p53 konnte mittels Sequenzierung ein Basenaustausch (TGG zu TAG) nachgewiesen werden [64]. Der Ursprung der Linie LMS 6-93 ist ein gering differenziertes Leiomyosarkom aus der Lunge eines 61-jährigen Patienten. Weite Tumorexzision gefolgt von Radiotherapie war auch in diesem Fall Behandlungsstrategie. Allerdings verstarb dieser Patient kurze Zeit später an den Folgen eines Herzinfarktes. Das Tumorsuppressorgen p53 der WTS-Linie LMS 6-93 verfügt über eine Basenpaarinsertion im Exon 6 (Kodon 215) [36]. Als vergleichbare p53-Null Zelllinie wurde in den Untersuchungen die Kultur von SAOS-2 herangezogen. Dieses Sarkom kann als Osteosarkom klassifiziert werden.

### **2.2.2 Zellkulturen**

Die Etablierung, Konservierung und Kultivierung aller drei verwendeten Zelllinien erfolgte im Institut für Pathologie der MLU Halle nach dort angewandten Standardprotokollen. Zur Durchführung dienten die in Tab. 2.5 und 2.6 angeführten Geräte und Chemikalien. Die Beurteilung kulturspezifischer Parameter (Verdopplungszeit und Platier-effizienz) wurde regelmäßig durchgeführt. Wachstumsmuster, Zellmorphologie und Zellzahl wurden vor der Verwendung für das *Comet-Assay* begutachtet. Die Kontrolle auf Mykoplasmen der Zellkulturen fand regelmäßig mittels DAPI-Färbung oder ELISA-Test ("Mycoplasma-detection-kit") statt. Falls ein Mykoplasmenbefall vorlag, wurden die Zellkulturen einer Behandlung mit dem Cyclin-B-Kit unterzogen.

Firma	Gerätebezeichnung
Bender (Blankenburg)	Neubauer-Zählkammer
Bioscience (Fernwald)	Biocenter 2001 (Brutschrank) automatische Pipette, Brenner MediaKap2 (Filter), Pipettenhalter
Coulter (Krefeld)	Z1 (Zellzählgerät), Isoton II (Puffer für Z1)
Greiner (Frickenhausen)	Zellkulturflaschen, Pipettenspitzen Pipetten, Zentrifugenröhrchen
Heraeus (Hanau)	Laminarbox
Hettich (Tuttlingen)	Zentrifuge Universal-30 RF
Hund (Wetzlar)	Umkehrmikroskop Wilovert
Merck (Darmstadt)	Handschuhe, Stoppuhr, Parafilm
Mettler (Gießen)	Analysenwaage Mettler AM 100
Nunc (Wiesbaden-Biebrich)	Kulturflaschen

Tabelle 2.5: *Geräte und Hilfsmittel zur Zellkultur im Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle*

Firma	Chemikalien
Bayer (Leverkusen)	Ciprofloxacin
Biowhittaker (Heidelberg)	RPMI 1640 (mit 25 mM HEPES und L-Glutamin, FKS) Natriumpyruvat
Boehringer Ingelheim (SERVA) (Ingelheim)	Penicillin-Streptomycin-Mixtur FKS, EDTA, Glutamin, Trypsin
Boehringer Mannheim (Mannheim)	Mykoplasmen-Detektions-Kit
Calbiochem	Koffein
Merck (Darmstadt)	Ethanol (96%), Salzsäure (37%)
SIGMA (St. Louis, MO, USA) GIBCO	Aspartat PBS

Tabelle 2.6: *Chemikalien zur Zellkultur im Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle*

## **Puffer und Lösungen für die Zellkultur**

### **PBS (pH 7,5)**

0,4 g KCl

8,0 g NaCl

0,3 g NaHCO<sub>3</sub>

1,0 g Glucose

0,2 g EDTA

in 1000 ml Aqua dest. lösen

sterilisieren und autoklavieren

Aufbewahrung bei 4°C

### **Kulturmedium**

500 ml RPMI-1640 mit HEPES und L-Glutamin

100 ml FKS

10 ml Penicillin/Streptomycin

5 ml Pyruvat

Aufbewahrung bei 4°C

### **RPMI - PBS**

100 ml FKS

10 g/l RPMI - PBS

in 1000 ml Aqua dest. lösen

sterilfiltern

Aufbewahrung bei 4°C

### **Trypsin - Lösung**

0,5 g Trypsin

in 100 ml PBS lösen

Aufbewahrung bei 4°C

Alle drei Zelllinien wuchsen als konfluente Monolayer-Kulturen. Als Nährmedium wurde RPMI 1640 mit 20% fötalem Kälberserum (FKS) verwendet. Zur Verhinderung eines Mykoplasmenbefalls setzte man dem Kulturmedium 1% Natriumpyruvat,

185 Einheiten/ml Streptomycin und 185  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Penicillin zu. Die Zellen wuchsen unter standardisierten Bedingungen bei 37°C Inkubator Temperatur mit 3% CO<sub>2</sub> angereicherter Luft.

## **Zellkultivierung und Passagierung**

Während der Kultivierung erfolgten Passagierung und Wechsel des Nährmediums in ähnlichen Arbeitsschritten. Nach Absaugen des verbrauchten Kulturmediums wurde die Zellkultur zweifach mit 37°C warmen PBS gespült. Über Zugabe von Trypsin und Einwirkung über 5 Minuten auf die Kultur konnten die Zellen aus den Kulturflaschen herausgelöst werden. Mit dem doppelten Volumen an Nährmedium wurde der Trypsinierungsvorgang abgestoppt. Nach Zentrifugieren bei 1000 Umdrehungen/min für 5 Minuten und Zugabe von neuem Nährmedium wurde das abgesetzte Zellpellet resuspendiert. Die Aussaat der Zellen in Kulturflaschen geschah im Verhältnis 1:3 bis 1:5. Wenn die Zellen noch nicht die gesamte Kulturflasche bedeckten, wurde nach den Waschvorgängen lediglich neues Nährmedium ersetzt.

In den hier gezeigten *Comet-Assay*-Untersuchungen wurden zwei Protokolle getestet. Das Ziel dieser Experimente bestand darin, so schnell wie möglich Reparaturvorgänge beenden zu können. Außerdem sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Präparationstechnik auf die untersuchten Parameter hat. Nach Abtrypsinieren der Zellen aus den Kulturflaschen bestimmte man die Zellzahl.  $3-4 \times 10^5$  Zellen wurden in 300  $\mu\text{l}$  Nährmedium in 1 ml Eppendorf - Gefäße pipettiert. Eine weiteres Zentrifugieren schloß sich für 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen/min an. Die Bestrahlung erfolgte unter Eiskühlung in Eppendorf-Gefäßen im Nährmedium. Anschließend wurde das Nährmedium abgesaugt und durch Agarose ersetzt. Die Agarose-Zellsuspension wurde in der Protokollvariante I auf Objektträger aufgetragen. Bei der Protokollvariante II erfolgte nach dem Zentrifugieren sofort die Präparation auf Objektträger gefolgt von der Bestrahlung.

### **2.2.3 Veränderungen im Comet-Assay-Protokoll**

Die hier verwendete Präparationstechnik ähnelt der anderer Arbeitsgruppen. In einem Testprotokoll wurden die Zellen in Eppendorf-Gefäßen mit Eiswasser gekühlt bei 4°C bestrahlt. Die Zellen lagen zu diesem Zeitpunkt als Pellet am Boden des Röhrchens. Darüber befanden sich 300  $\mu\text{l}$  RPMI 1640 mit 15% FKS. Nach Abpipettieren des Nährmediums wurde das Zellpellet in 100  $\mu\text{l}$  RPMI 1640 - LMP-

Agarose mit 20% FKS resuspendiert. Unverzüglich schloß sich der Auftrag auf die Objektträger an. Nach Aufbringen einer Deckschicht aus LMP-Agarose und deren Festwerden wurden die Objektträger in die 4°C-kalte Lyselösung getaucht. Vom Ende der Bestrahlung bis zum Eintauchen in die Lyselösung vergingen im Idealfall knapp 10-15 Minuten. Für die Reparaturuntersuchungen nach Bestrahlung in Eppendorf-Gefäßen wurden diese im Brutschrank bei 37°C für  $t_{10} = 10$ ,  $t_{30} = 30$ ,  $t_{60} = 60$  und  $t_{120} = 120$  Minuten inkubiert. Nach Ablauf der vorgegeben Reparaturzeiten wurde das Nährmedium aus den Röhrchen abgesaugt. Die Resuspension des Zellpellets erfolgte in 100  $\mu$ l 0,5% RPMI 1640-LMP-Agarose. Nach Festwerden und Auftrag einer Deckschicht wurden die Objektträger in Lyselösung umgesetzt. In einer von uns erprobten Variante wurden die Tumorzellen auf Objektträger, in 0,5% RPMI-LMP-Agarose eingebettet, direkt bestrahlt. Nach Präparation einer dritten Agaroseschicht erfolgte die Bestrahlung auf Eis. Für die Untersuchung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurden die Objektträger nach Ende der Bestrahlung in 4°C-kalte Lyselösung eingetaucht. Als Nährmedium für Reparaturuntersuchungen nutzten wir 5 ml RPMI 1640 und 15% FKS. Die Objektträger wurden nach der Bestrahlung in Quadripermschalen mit Kulturmedium über den entsprechenden Reparaturzeitraum gelegt. Nach dem Abtropfen der Nährlösung am Ende des Reparaturintervalls wurden die Objektträger in Lyselösung getaucht. Ab diesem Punkt liefen die *Comet-Assay*-Experimente für beide Testprotokolle in der selben Weise ab. Der minimale Zeitraum des Lysevorganges betrug 1 Stunde bei 4°C im Kühlschrank. Danach schlossen sich das Entwinden und die Elektrophorese an. Über Nacht wurde die Neutralisation bei 4°C durchgeführt. Die Auswertung erfolgte dann am nächsten Tag nach Anfärben der DNS mit Ethidiumbromid am Fluoreszenzmikroskop.

## 2.3 Patientengruppe mit Nebenwirkungen

Fünf Patienten, welche unter einer normfraktionierten Strahlentherapie unterhalb einer Gesamtdosis von 20 Gy mit stark akuten Nebenwirkungen (klassifiziert nach CTC) reagierten, wurden vier Wochen nach Ende der Strahlentherapie im *Comet-Assay* bezüglich der Reaktion auf Strahlung und der Reparaturfähigkeit ihrer Leukozyten untersucht. Die Blutabnahme erfolgte in Zitrat-Monovetten. Eine Blutbildbestimmung verlief simultan. Es wurde die oben beschriebene *Comet-Assay*-Präparationstechnik (drei Schichten) verwendet. Die Bestrahlung erfolgte auf eisgekühlten

Piacryl-Platten nach Einbettung in Agarosegel auf Objektträger. Die Inkubationszeit bei 37°C betrug maximal 60 Minuten für Reparaturuntersuchungen. Zwei weitere Patienten mit chronischen, radiogen induzierten Nebenwirkungen wurden ebenfalls einbezogen. In der folgenden Tabelle (Tab.2.7) sind die Patientencharakteristika dargestellt.

ID m/w	Alter	Diagnose	Radiatio	NW akut	NW spät	Besonderheiten
I.G. w	72	MagenCa	1. 3 Gy ad 12 Gy 2. 2 Gy ad 12 Gy 3. 2 Gy ad 16 Gy	Übelkeit, Erbrechen CTC III <sup>o</sup>	keine	Tumorregredienz nach 12 Gy bei 1. RT
H.D. m	65	LarynxCa	2 Gy ad 64 Gy	Radiodermatitis III <sup>o</sup> Mucositis III <sup>o</sup>	Teleangiektasien mäßige Fibrose	Laryngektomie Zungengrundresektion rad. Neck dissection
G.K. m	60	TonsillenCa	2 Gy ad 64 Gy	Radiodermatitis II-III <sup>o</sup> Mucositis II-III <sup>o</sup>	Xerostomie	
B.V. m	55	ZungengrundCa	1. 2 Gy ad 58 Gy 2. 3 Gy ad 36 Gy	Mucositis III-IV <sup>o</sup> Radiodermatitis III <sup>o</sup>	Teleangiektasien Mucositis	1. RT Th.abbruch bei 58 Gy 2. RT aufgrund Rezidiv
M.A. w	65	sakrales Chordom	2 Gy ad 52 Gy	Diarrhoe III-IV <sup>o</sup> Colitis	keine	Th.abbruch bei 52 Gy
S.K. w	58	MammaCa	1. 1,8 Gy ad 50,4 Gy 2. Boost 2 Gy ad 10 Gy	Radiodermatitis II-III <sup>o</sup> Hyperpigmentierung	Hyperpigmentierung massive Fibrose der Restbrust Lymphödem	Z.n. BET Axilladissektion
R.H. w	56	MammaCa	2 Gy ad 50 Gy	Radiodermatitis II <sup>o</sup>	massive Teleangiektasien	Spätreaktion nach 3 Jahren

Tabelle 2.7: Charakterisierung des Patientenkollektivs mit akuten und chronischen schweren, radiogen induzierten Nebenwirkungen klassifiziert nach Common Toxicity Criteria (CTC) für akute und RTOG für chronische Nebenwirkungen

## 2.4 Untersuchungen während Ganzkörperbestrahlungen

Ein Vergleich zwischen in-vivo und in-vitro ablaufenden Reparaturuntersuchungen ist unter den Bedingungen einer Ganzkörperbestrahlung möglich. Aus unserem Krankengut untersuchten wir drei Patienten (Tab.2.8). Die Ganzkörperbestrahlung erfolgte zur Konditionierung einer geplanten Stammzelltransplantation nach Hochdosis-Chemotherapie. Das Einverständnis der Patienten zur Blutentnahme nach entsprechender Aufklärung über die *Comet-Assay*-Experimente lag vor. Die Bestrah-

Nr.	Initialen	Diagnose	Alter	Dosis
1	R.F. m	NHL	44	12 Gy TBI
2	D.F. w	NHL	48	12 Gy TBI
3	R.P. w	Multipl. Myelom	50	9 Gy TMI

Tabelle 2.8: *Patientencharakteristika zur Ganzkörperbestrahlung bzw. Ganzknochenmarkbestrahlung (TBI - total body irradiation; TMI - total marrow irradiation)*

lung aller drei Patienten wurde am Mevatron KD2 (Fa. Siemens) in "Sweeping beam"-Technik durchgeführt. Die Ganzkörperbestrahlung erfolgte in 6 Fraktionen mit einer Einzeldosis von 2 Gy. Zwischen zwei Fraktionen an einem Tag lagen mindestens 6 Stunden. Für jeden Patienten dauerte eine Bestrahlungssitzung ungefähr 120 Minuten. Die maximale Lungendosis bei den beiden NHL-Patienten betrug 8 Gy, bei der Patientin mit dem Multiplen Myelom nur 6 Gy. Bei dieser Patientin betrug die Fraktionsdosis 1,5 Gy und die gesamt applizierte Dosis 9,0 Gy. Zwei Monate vor der Ganzknochenmarkbestrahlung erfolgte in diesem Fall eine Bestrahlung von insgesamt sechs Wirbelsegmenten. Auf die HWK 6-BWK 2 wurde eine Gesamtdosis von 30 Gy gegeben. Zur gleichen Zeit erfolgte die Bestrahlung von BWK 6-8 bis zu einer Gesamtdosis von 27 Gy.

Vor der ersten Bestrahlung fand eine Blutentnahme zur Bestimmung der DNS-Basisschädigung, zur Aufnahme einer Dosis-Wirkungs-Kurve und der In-vitro-Reparaturfähigkeit nach In-vitro-Bestrahlung statt. Die In-vitro-Reparaturuntersuchungen wurden ausschließlich nach einer Einzeldosis von 2 Gy durchgeführt. Der schematische Ablauf des Experiments ist im Folgenden dargestellt (Abb.2.2). Für die Präparation der untersuchten Lymphozyten fand der ursprüngliche Mehrschicht-Agarosenauftrag Verwendung. Die Blutproben wurden eisgekühlt. Aus den jeweils

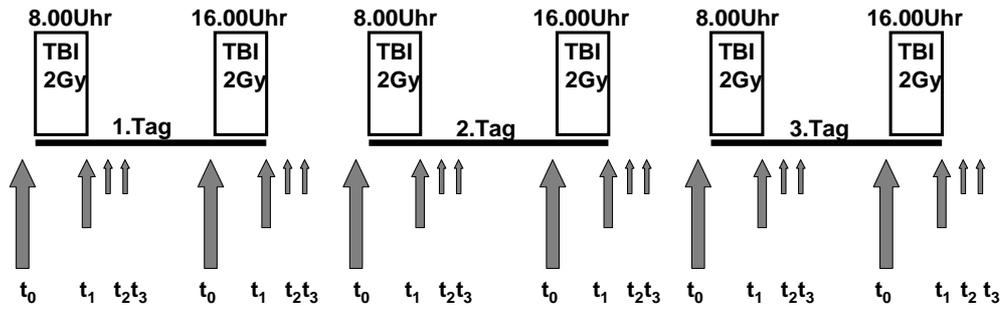


Abbildung 2.2: Der Zeitablauf der Comet-Assay-Experimente während einer Ganzkörperbestrahlung. Zu den gezeigten Zeiten  $t_0 - t_3$  erfolgte die Abnahme von venösem Blut.  $t_0$ : vor jeder Bestrahlung  $t_1$  - sofort nach Bestrahlung (15 und 30 min In-vitro-Reparatur)  $t_2$  - 15 Minuten nach Bestrahlung  $t_3$  - 30 Minuten nach Bestrahlung

ersten Blutproben nach jeder Fraktion wurden Objektträger für In-vitro-Reparaturexperimente hergestellt. Die Reparatur lief im Inkubator nach Eintauchen in Nährmedium (RPMI 1640 und 15% FKS) für 15 bzw. 30 Minuten ab. Parallel dazu erfolgten Blutbildkontrollen, um den Anteil an Lymphozyten und Granulozyten zu messen, da im durchgeführten Protokoll keine Separation der Leukozytenpopulationen vorgenommen wurde.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Sarkomzellkulturen

Zur Untersuchung kamen drei verschiedene Sarkomzelllinien. Diese Tumorentität gilt weithin als relativ radioresistent. Für alle drei Zellsysteme kann man anhand der vorliegenden Resultate schließen, daß die gemessenen strahlenbiologischen Effekte sowohl zeit- als auch dosisabhängig sind. Im Koloniebildungstest und in Vitalitätstests für die Zelllinie US 8-93 kam es nach der Applikation kleinerer Strahlendosen (0, 2, 4 Gy) zu einer Zellwachstumsverzögerung und geringfügigen Abnahme der Vitalität. Außerdem führten höhere Strahlendosen (6, 12, 24 Gy) zum Verlust des Zellwachstums und zu einer deutlichen Vitalitätseinbuße. Nach diesen Dosen trat ein strahleninduzierter G2/M-Block mit maximaler Ausprägung 24 Stunden nach der Bestrahlung auf. Erst nach Verlassen dieses Zellzykluskontrollpunktes war ein Ansteigen in der Apoptosefrequenz zu verzeichnen [4].

#### 3.1.1 Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Mit Hilfe der *Comet-Assay*-Experimente mit den selbstetablierten Linien US 8-93 und LMS 6-93 ließ sich feststellen, daß beide Zelllinien dosis- und zeitabhängig auf Bestrahlung reagieren. Diese Ergebnisse stammen aus Untersuchungen, die nach der Protokollvariante II durchgeführt wurden. Dabei zeigte die Linie US 8-93 einen deutlich höheren Initialschaden als LMS 6-93. Zu Beginn besaßen beide einen nahezu identischen Kurvenverlauf für die Dosis-Wirkungs-Beziehung. Eine Unterscheidung war erst oberhalb einer Dosis von 3 Gy möglich, beide Kurven zeigten einen unterschiedlichen Verlauf. Der Unterschied zwischen beiden Zellkulturen wurde am

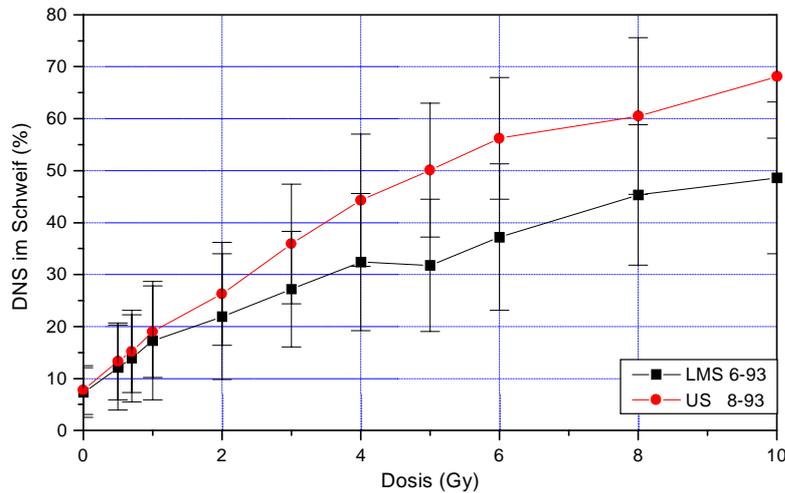


Abbildung 3.1: Dosis-Wirkungs-Kurven für die zwei Sarkomzelllinien LMS 6-93 und US 8-93 nach Bestrahlung auf Objektträgern

Vergleich der Initialschäden bezogen auf den jeweiligen Basalschaden deutlich. Bis zu einer Strahlendosis von 2 Gy verhielten sich beide Kurven sehr ähnlich (Abb.3.1). Es kam zu einer Verstärkung des Initialschadens bei 2 Gy auf das 3,0 versus dem 3,4-fachen (LMS 6-93 vs. US 8-93) des Basalschadens. Ab einer Dosis von 4 Gy trat bei LMS 6-93 ein Initialschaden auf, der um das 4,4-fache erhöht war. Dagegen betrug dieser Wert für die Linie US 8-93 bereits das 5,7-fache des Basalschadenniveaus. Nach Bestrahlung mit 10 Gy auf die präparierten Zellen wurde ein Unterschied zwischen dem 6,7-fachen für LMS 6-93 vs. dem 8,7-fachen für US 8-93 festgestellt. Eine statistische Signifikanz ist aber wegen des Überlappens der Fehlerbalken nicht gegeben. **Bemerkung:** Da das für alle hier vorgestellten Ergebnisse gilt, wird in diesem Rahmen auf eine quantitative Analyse verzichtet und die Ergebnisse werden nur qualitativ diskutiert.

Die SAOS-2-Linie ist eine sehr empfindliche Zellkultur, welche nur nach Protokollvariante I präpariert werden konnte. Zum Vergleich der Resultate wurden die Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 in der selben Weise präpariert. Alle drei Zelllinien konnten (US 8-93, LMS 6-93 und SAOS-2) bezüglich ihrer Strahlenempfindlichkeit unterschieden werden. Betrachtete man die Initialschäden, ließ sich zeigen, daß die Probe von SAOS-2, gefolgt von US 8-93 am empfindlichsten reagierte (Abb.3.2). Die Linie LMS 6-93 erwies sich auch in den *Comet-Assay*-Untersuchungen als relativ strahlenresistent. Diese Aussage wird durch den Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurven unterstrichen. Für US 8-93 und LMS 6-93 konnte wie in den Koloniebildungs-

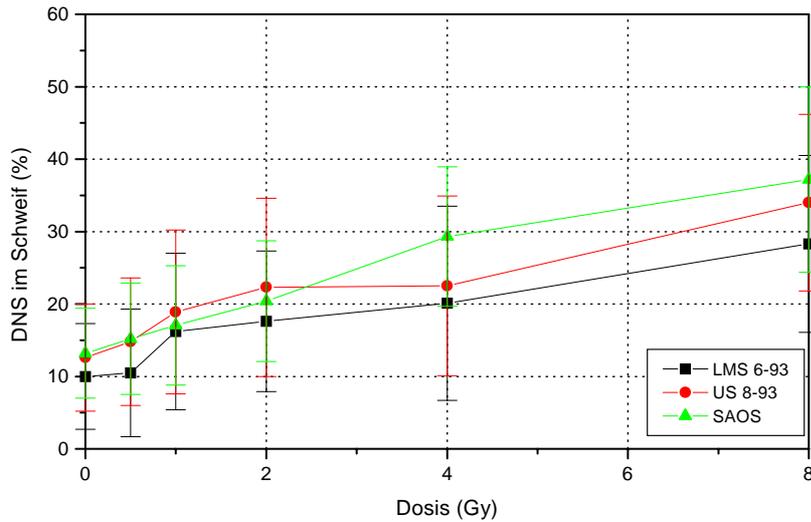


Abbildung 3.2: Dosis-Wirkungs-Kurven der drei untersuchten Sarkomzelllinien LMS 6-93, US 8-93 und SAOS nach Bestrahlung in Eppendorf-Röhrchen

versuchen ein schulterförmiger Kurvenverlauf mit den *Comet-Assay*-Experimenten gezeigt werden. Allerdings scheinen die *Comet-Assay*-Untersuchungen eine bessere Diskrimination beider Zellkulturen zu ermöglichen. Nach Berechnung der  $\alpha$ -Werte von Gerlach et al. entsprechen die Ergebnisse des Koloniebildungstests und die der *Comet-Assay*-Versuche einander [25, 54] (US 8-93  $\alpha$ -Wert Koloniebildungstest mit 0,11016 im Vergleich zu  $\alpha$ -Wert *Comet-Assay* mit  $0,114 \pm 0,004$  und LMS 6-93  $\alpha$ -Wert Koloniebildungstest mit 0,09634 im Vergleich zu  $\alpha$ -Wert *Comet-Assay* mit  $0,064 \pm 0,003$ ).

### 3.1.2 Koffeineinfluß auf den DNS-Schaden

Nach Koffeininkubation der beiden Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 sollte mit dem *Comet-Assay* untersucht werden, ob eine Veränderung der Strahlenempfindlichkeit nachweisbar ist. Koffein wurde für diese Untersuchungen in PBS gelöst dem Kulturmedium zugefügt. In Vorversuchen von Bache et al. konnte kein wesentlicher Einfluß von PBS auf die Strahlensensibilität nachgewiesen werden [5].

Die zwei untersuchten Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 wurden mit 1 mM Koffein für 24 Stunden inkubiert. Betrachtete man nur die DNS-Basalschäden nach 24-stündiger Inkubation, so nahm dieser Schadensanteil im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei beiden Linien um den Faktor 1,1 zu. Nach Bestrahlung mit Dosen von

0,5; 1; 2; 4 und 8 Gy konnte man anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität im Schweif des Kometen feststellen, daß es durch Koffein- und Einwirkung von Röntgenstrahlung zur Auslösung eines größeren Initialschadens kam. Desweiteren konnte

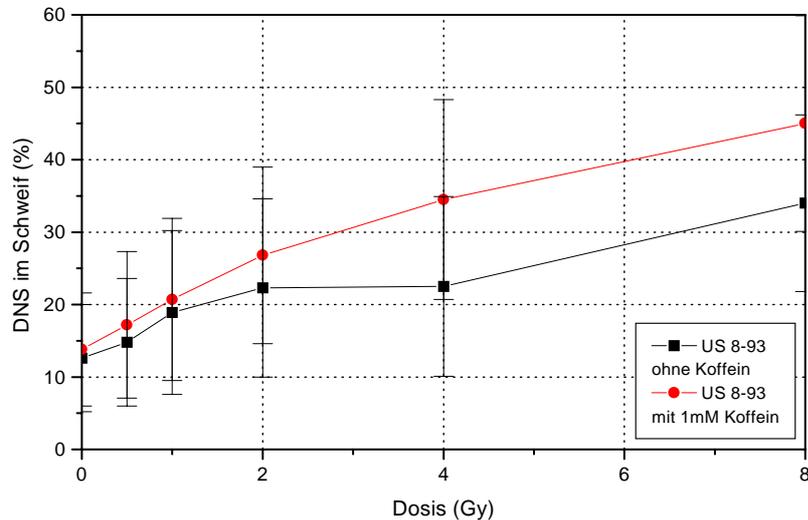


Abbildung 3.3: Dosis-Wirkungs-Kurven für die Zelllinie US 8-93 mit und ohne Koffeininkubation. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in Eppendorf-Röhrchen.

für die Zelllinie US 8-93 (Abb.3.3) eine höhere Strahlenempfindlichkeit nachgewiesen werden. Mit Zunahme der Bestrahlungsdosis wurde dieser Effekt deutlicher. Bei einer Dosis von 2 Gy nahm der DNS-Initialschaden für US 8-93 vom 1,8-fachen auf das 2,1-fache des Basalschadens zu. Für LMS 6-93 (Abb.3.4) hingegen war nur ein Anstieg vom 1,8-fachen auf das 2,0-fache zu verzeichnen. Nach Bestrahlung mit 8 Gy kam es zur Sensitivierung vom 2,7-fachen auf das 3,6-fache für US 8-93 und vom 2,8-fachen auf das 3,5-fache im Vergleich zum Basalschaden.

### 3.1.3 Reparaturuntersuchungen

Reparaturuntersuchungen wurden an den Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 durchgeführt, wobei die auf Objektträgern präparierten Zellen nach der Bestrahlung in RPMI 1640 Komplettmedium für 30, 60 und 120 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Für beide Zellkulturen konnte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität des Schweifes und Zunahme der des Kopfes über das genannte Reparaturzeitintervall im Vergleich zum Initialschaden festgestellt werden. Betrachtet man den Residualschaden, so wird

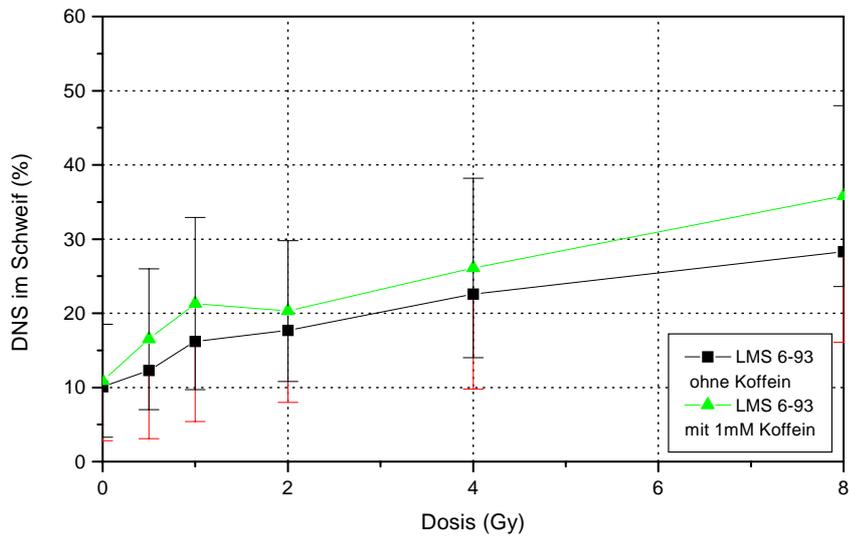


Abbildung 3.4: Dosis-Wirkungs-Kurven der Zelllinie LMS 6-93 mit und ohne Koffeinkubation. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in Eppendorf-Röhrchen.

deutlich, daß er sich im Zeitraum von 120 Minuten vermindert. In beiden Zelllinien ist die größte Abnahme des Initialschadens bei Bestrahlungsdosen oberhalb 2 Gy innerhalb der ersten 30 Minuten zu verzeichnen. Der Verlauf der Kurven entspricht einer Exponentialfunktion. Trotz eines höheren Initialschadens repariert US 8-93 offensichtlich in kürzerer Zeit einen größeren relativen DNS-Schaden (Tab.3.1). Mit

Dosis $D$ (in Gy)	RD nach 120 min LMS 6-93	RD nach 120 min US 8-93
1	31,0%	50,0%
2	12,0%	35,7%
4	46,2%	19,8%
8	30,8%	20,7%
10	49,4%	16,1%

Tabelle 3.1: Errechnete Residualschäden (RD) für die Weichteilsarkomzelllinien LMS 6-93 und US 8-93

steigender Strahlendosis nimmt in der Zelllinie US 8-93 der Residualschaden über 120 Minuten ab. Dagegen ist bei den Untersuchungen der Zelllinie LMS 6-93 ein gegensätzlicher Trend zu verzeichnen. Der minimal erreichte Residualschaden beträgt bei 8 Gy 31%. Bei allen übrigen Strahlendosen wurden nach 120 Minuten Reparaturzeit höhere Residualschäden (40-50%) nach der unter Kap. 2.1 angegebenen Formel (2.3) berechnet. Es konnte für beide Zelllinien ein biphasischer Verlauf der Repara-

Dosis $D$ (in Gy)	LMS 6-93 $v(t_0, t_{30}, D)$	LMS 6-93 $v(t_{30}, t_{60}, D)$	LMS 6-93 $v(t_{60}, t_{120}, D)$
1	-0,034	-0,0037	+0,0008
2	-0,039	-0,0037	-0,0010
4	-0,027	-0,0037	-0,0006
8	-0,046	+0,0038	-0,0039
10	-0,057	+0,0100	-0,0027

Tabelle 3.2: *Errechnete Reparaturgeschwindigkeiten für die Zelllinie LMS 6-93.*

Dosis $D$ (in Gy)	US 8-93 $v(t_0, t_{30}, D)$	US 8-93 $v(t_{30}, t_{60}, D)$	US 8-93 $v(t_{60}, t_{120}, D)$
1	+0,0126	-0,0081	-0,0030
2	-0,0179	-0,0058	-0,0016
4	-0,0418	-0,0047	-0,0018
8	-0,0679	+0,0021	-0,0013
10	-0,0617	+0,0008	-0,0025

Tabelle 3.3: *Errechnete Reparaturgeschwindigkeit für die Zelllinie US 8-93.*

tur bestätigt werden. Die Zelllinie US 8-93 verfügt über eine größere Reparaturgeschwindigkeit als die Zelllinie LMS 6-93. Die Reparaturgeschwindigkeit  $v(t, t', D)$  ist näherungsweise durch den folgenden Differenzenquotienten gegeben:

$$v(t, t', D) = \frac{\text{DNS im Schweif}(t, D) - \text{DNS im Schweif}(t', D)}{(t - t') * \text{DNS im Schweif}(t_0, D)}. \quad (3.1)$$

Die Geschwindigkeit der Reparatur wird hier über die Schadensminderung pro Minute angegeben. Die Symbole  $t$  und  $t'$  bezeichnen die Reparaturzeiten, nach denen jeweils eine Messung erfolgte ( $t_0, t_{30}, t_{60}, t_{120}$ ). Während der Betrag der negativen Werte die Geschwindigkeit bei der Reparatur angeben, entsprechen positive Werte einer Zunahme des DNS-Schadens. Alle errechneten Werte für die Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 sind in den Tabellen 3.2 und 3.3 angegeben. Innerhalb der ersten 30 Minuten wurde die Hauptmasse des DNS-Schadens behoben. Die erste Reparaturphase beinhaltet offensichtlich schnelle Reparaturvorgänge, während in der zweiten Phase hauptsächlich langsamer repariert wird. Dieses Aussage gilt für beide Zelllinien. Offensichtlich nimmt bei steigender Bestrahlungsdosis die Reparaturgeschwindigkeit zu. Es ist zu sehen, daß sich die Geschwindigkeiten in beiden Zelllinien in der ersten Reparaturphase fast vollständig entsprechen. In der letzten hier untersuchten

Reparaturzeit von 120 Minuten verfügt die Zelllinie US 8-93 in allen Dosisbereichen über eine ähnliche Reparaturgeschwindigkeit. Für die Zelllinie LMS 6-93 bleibt festzustellen, daß nur für höhere Dosen von 8 und 10 Gy im Vergleich zu den restlichen Dosen eine größere Reparaturgeschwindigkeit berechnet wurde.

## **3.2 Patienten mit akuten und späten radiogen bedingten Nebenwirkungen**

Blutproben von fünf Patienten mit starken akuten Nebenwirkungen konnten mit diesem Testsystem untersucht werden. Dabei wurden von einer Patientin über den Zeitraum von einem Jahr dreimal *Comet-Assay*-Untersuchungen an Leukozyten durchgeführt. Es wurden nur Patienten einbezogen, welche Grad *III* und *IV* Nebenwirkungen (nach CTC) unterhalb einer Gesamtdosis von 20 Gy entwickelt hatten. Die Patientengruppe mit sehr starken Spätnebenwirkungen bestand nur aus zwei Patientinnen. In der Gruppe mit akuten Nebenreaktionen waren vor allem Schleimhautreaktionen verstärkt, wogegen bei den zwei Patientinnen mit Spätreaktionen hauptsächlich Teleangiectasien und massive Fibrosen auftraten.

### **3.2.1 Dosis-Wirkungs-Beziehungen**

Die Patientin, die dreifach untersucht wurde, litt an einem Magenkarzinom. Bei der ersten Bestrahlung wegen eines Rezidivs im Abdomen 10 Jahre nach Primärdiagnose, mußte die Radiatio nach 12 Gy auf Grund akuter Nebenwirkungen (Übelkeit, Erbrechen, III° CTC) abgebrochen werden. Geplant war die Applikation von 30 Gy in Einzeldosen von 3 Gy. Nach sechs Monaten war in der Computertomographie des Abdomens eine deutliche Tumorrogressionsnachweisbar. Eine erneute Bestrahlung wegen eines Rezidivs nach weiteren sechs Monaten mit Einzeldosen von 2 Gy bis zu einer Gesamtdosis von 12 Gy wurde von der Patientin gut toleriert. Nach über einem Jahr bildete sich ein drittes Rezidiv. Bei der erneuten Bestrahlung, die mit Einzeldosen von 2 Gy bis 16 Gy geplant war, mußte die Therapie bei 10 Gy aufgrund starker akuter Nebenwirkungen abgebrochen werden. In allen drei erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven ist eine ähnliche Schadensausbildung zu erkennen (Abb.3.5). Die Meßwerte weisen keine signifikanten Unterschiede auf (Abb.3.6).

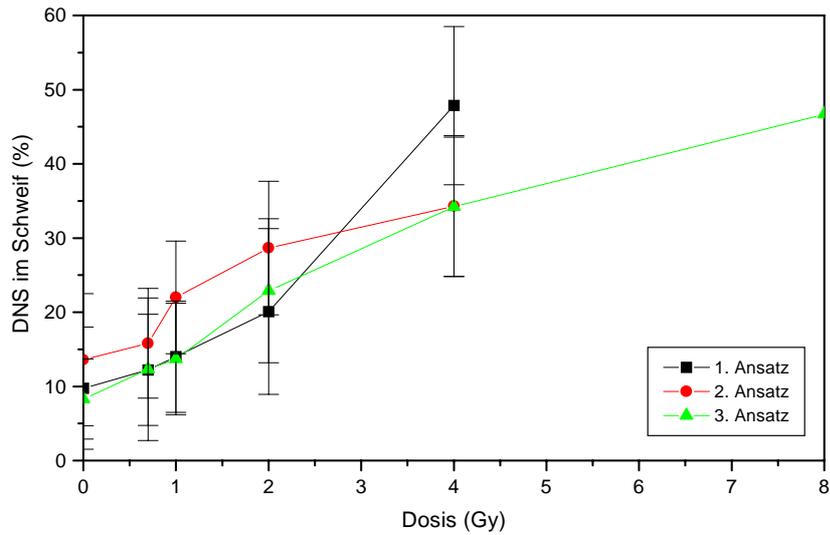


Abbildung 3.5: Dosis-Wirkungs-Kurven der Patientin IG (DNS im Schweiß (%)). Die dargestellten Standardabweichungen sind auf 50 ausgewertete Zellen pro Dosis bezogen.

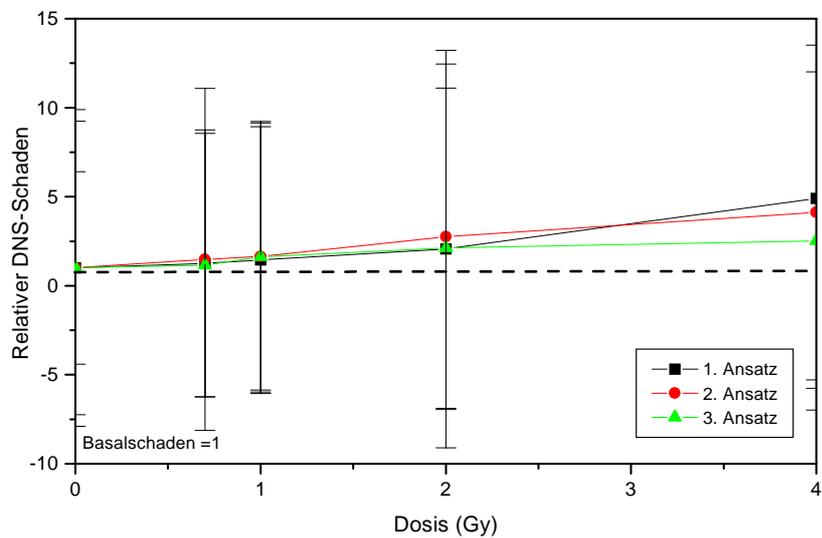


Abbildung 3.6: Die Untersuchungen der Dosis-Wirkungs-Kurven der Patientin IG - wurden dreimal innerhalb eines Jahres wiederholt. Der DNS-Basalschaden bei 0 Gy wurde gleich 1 gesetzt, und alle folgenden Initialschäden sind daraus berechnet. Die angegebenen Standardabweichungen beziehen sich auf 50 ausgewertete Zellen pro Dosis.

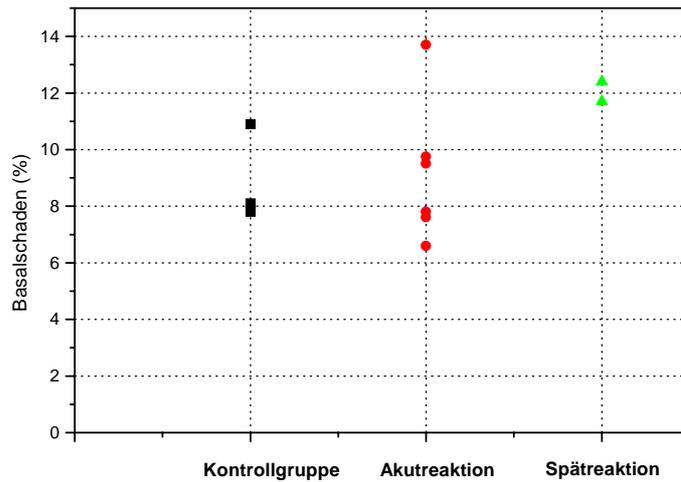


Abbildung 3.7: Vergleich der DNS-Basalschäden geordnet nach Gruppenzugehörigkeit zu Kontrollpersonen, Patienten mit akuten und chronischen Nebenwirkungen

Der Basalschaden, also die Vorschädigung der Leukozyten, zeigte für die Gruppe der Akutreakturer eine große Variationsbreite (6,5 - 13,8% *DNS im Schweif*). Die Basalschäden der Normal- (8 - 11% *DNS im Schweif*) und Spätreakturer (11 - 12,5% *DNS im Schweif*) lagen jeweils dicht beieinander, wobei für die Gruppe der Spätreakturer ein höherer Basalschaden gemessen wurde (Abb.3.7). Bei der Untersuchung der Initialschäden nach Bestrahlung konnte kein Unterschied zwischen der Überreakturer- und Normalgruppe gefunden werden. Die zwei Patienten mit schweren Spätreaktionen zeigten hingegen Initialschäden, die sich im unteren Bereich der Kurvenschar aller untersuchten Probanden bewegten (Abb.3.8). Die Kurven für den Initialschaden der Kontrollgruppe wie die der Akutüberreakturer lagen dicht beieinander.

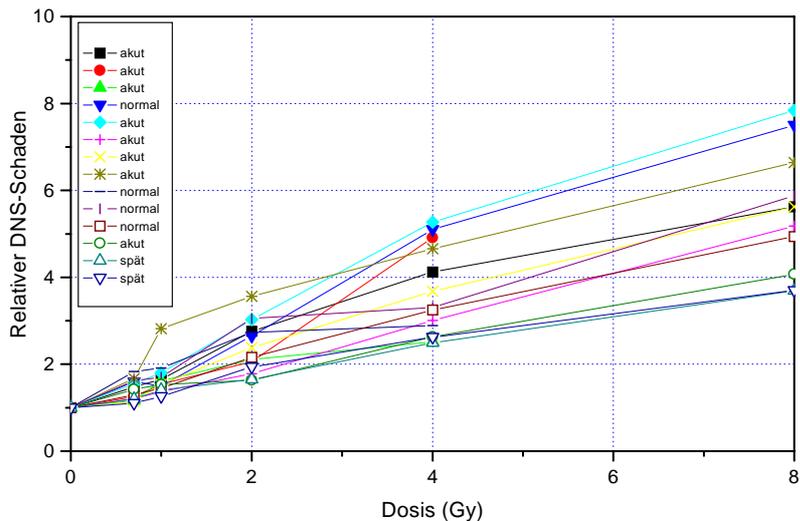


Abbildung 3.8: Dosis-Wirkungs-Kurven aller untersuchten Personen unter Einbeziehung von Patienten mit stark ausgeprägten akuten und chronischen Nebenreaktionen sowie der Kontrollgruppe. Der DNS-Basalschaden eines Probanden bei 0 Gy wurde gleich 1 gesetzt. Die Angaben der Initialschäden beziehen sich auf diesen Wert und entsprechen einem Vielfachen davon.

### 3.2.2 Reparaturuntersuchungen

Zur Verdeutlichung der Reparatur sind Kometen nach Bestrahlung mit 4 Gy einer Kontrollperson dargestellt (Abb.3.9). Unterschiede in der Verteilung der Residualschäden waren bei einer Dosis von 4 Gy deutlich. Die Patienten mit Spätreaktion zeigten sogar eine Zunahme des Residualschadens nach der Reparaturzeit von 60 Minuten (Abb.3.10). Bei einer Dosis von 0,7 Gy liefen die Reparaturvorgänge offensichtlich in allen drei Gruppen ungeordnet ab (Daten hier nicht gezeigt) [55]. Es bestand eine deutliche Differenz zwischen den Residualschäden der Kontrollgruppe versus Spätreagierer wie auch der Akutreagierer versus Spätreagierer bei 2, 4 und 8 Gy (Abb.3.11). Bei den Akutreagieren und der Kontrollgruppe wurden zwei Phasen des Reparaturvorganges sichtbar. Innerhalb der ersten 10 Minuten nach Bestrahlungsende wurden für die Kontrollgruppe 30 bis 50% des Initialschadens und für die Akutüberreagierer 15 bis 65% repariert. Dieser Zeitraum umfaßt die sog. Phase I der Reparatur. Die zwei Patienten mit massiver Spätreaktion zeigten in der Phase I der Reparatur eine Abnahme um 20 bis 45% des Initialschadens. In der Phase

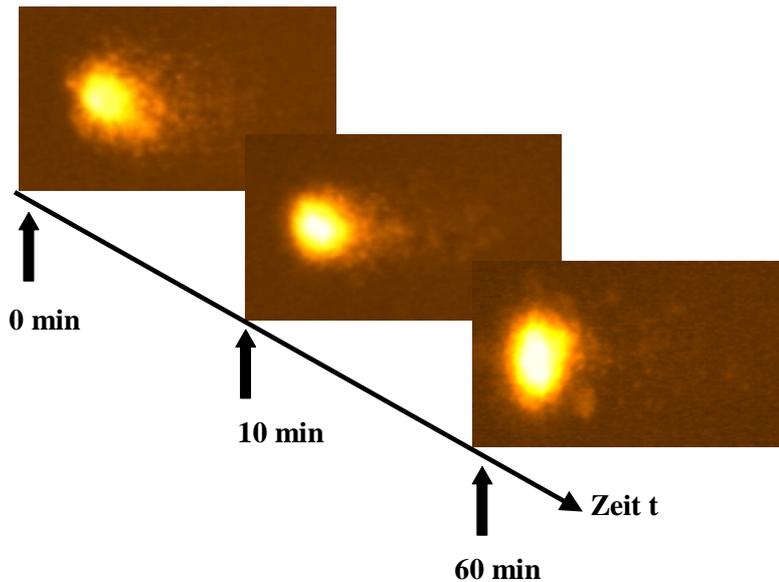


Abbildung 3.9: Kometen mit verschiedenen Inkubationszeiten zur Verdeutlichung des unterschiedlichen Reparaturverlaufs. Die hier gezeigten Lymphozyten einer Kontrollperson wurden mit 4 Gy bestrahlt und nicht bzw. für 10 und 60 Minuten im Nährmedium inkubiert.

II kam es bis zum festgelegten Reparaturrendpunkt nach 60 Minuten zum erneuten Anstieg des DNS-Schadens. In den beiden anderen Gruppen zeigte sich eine stetige Senkung des Residualschadens nach weiteren 20 Minuten. Nur bei einem Patienten mit Akutreaktion nahm der Residualschaden zu. Nach 60 Minuten kam es aber auch hier zum Absinken des Residualschadens.

### 3.2.3 Unterschiede in der Kometenstruktur

Bei drei Patienten mit akuten Nebenwirkungen verfügten die Kometen über eine größere Korona mit geringer Fluoreszenzintensität. Diese Kometen zeigten außerdem Strukturen am Kometenkopf, welche wie kleine "Ohren" aussahen. Das Kometenbild der Gruppe mit Spätreaktionen dagegen wies bei vielen Kometen eine deutlich wahrnehmbare Fragmentation auf. Es bestanden Gebiete mit höherer Fluoreszenzintensität als im übrigen Schweif. Diese Fragmentation nahm offensichtlich mit steigender Dosis zu. Oberhalb einer Bestrahlungsdosis von 5 Gy verringerte sich die Fluoreszenzintensität, weshalb nicht alle Patientendaten bis 8 Gy auswertbar waren.

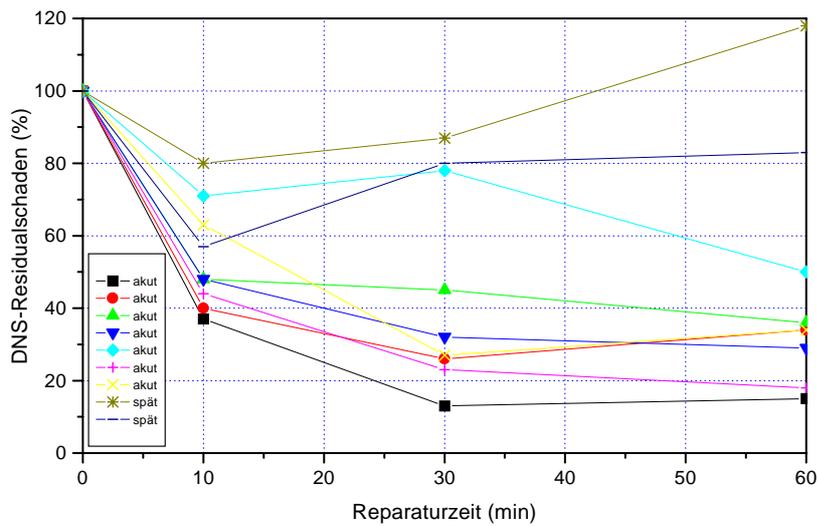


Abbildung 3.10: Residualschäden der Patienten mit akuten und späten Nebenreaktionen. Der Initialschaden unmittelbar nach Bestrahlung entspricht 100%. Die Berechnung des Residualschadens erfolgte nach der in Kap. 2.1 angegebenen Formel.

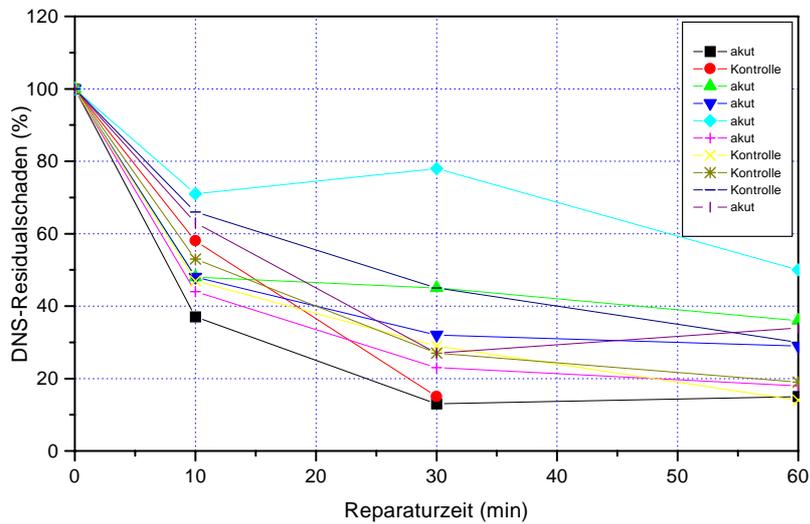


Abbildung 3.11: Residualschäden der Patienten mit akuten Nebenreaktionen und der Kontrollgruppe. Der Initialschaden unmittelbar nach Bestrahlung entspricht 100%. Die Berechnung des Residualschadens erfolgte nach der in Kap. 2.1 angegebenen Formel.

## 3.3 Untersuchungen während Ganzkörperbestrahlungen

### 3.3.1 Blutbildveränderungen

Bei zwei von drei Patienten erfolgten im Verlauf der Ganzkörperbestrahlung Blutbildbestimmungen. Da in den hier gezeigten Experimenten keine Auftrennung in Lymphozyten und Granulozyten und die jeweiligen Subpopulationen erfolgte, sollte anhand der Blutbilduntersuchungen festgestellt werden, welche Zellpopulation zum jeweiligen Zeitpunkt untersucht wurde. Allein aus Zeitgründen erschien eine Zellseparation wenig sinnvoll, da wir an der Verminderung des DNS-Schadens unter in-vivo und In-vitro-Bedingungen interessiert waren. Eine Zellseparation hätte die schnelle erste Reparaturphase überlagert.

Bei beiden Patienten war eine leichte Abnahme des Hämoglobinwertes zu verzeichnen. Deutliche Veränderungen sah man an der Zahl der Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten. Es bestand ein inverses Verhalten von Lymphozyten zu neutrophilen Granulozyten. Bei beiden Patienten war bis zu einer Gesamtdosis

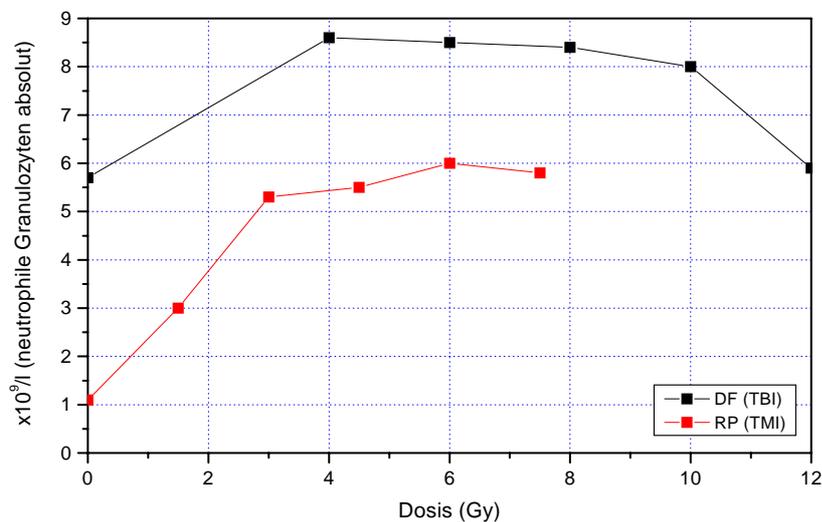


Abbildung 3.12: Verhalten der neutrophilen Granulozytenpopulation im peripheren Blut, dargestellt für zwei Patienten (DF und RP) während einer fraktionierten Ganzkörperbestrahlung (TBI) bzw. Ganzknochenmarkbestrahlung (TMI)

von 4 Gy bzw. 3 Gy ein Granulozytenanstieg ( $1 \times 10^9/l$  auf  $5,6 \times 10^9/l = 560\%$  und

$5,7 \times 10^9/l$  auf  $8,6 \times 10^9/l = 154\%$ ) meßbar (Abb.3.12). Danach bestand eine Plateauphase. Nach Erreichen einer Gesamtkörperdosis von 10 Gy bzw. 7,5 Gy sank die Anzahl der Granulozyten auf das Ausgangsniveau ab. Die Lymphozytenzahl zeigt

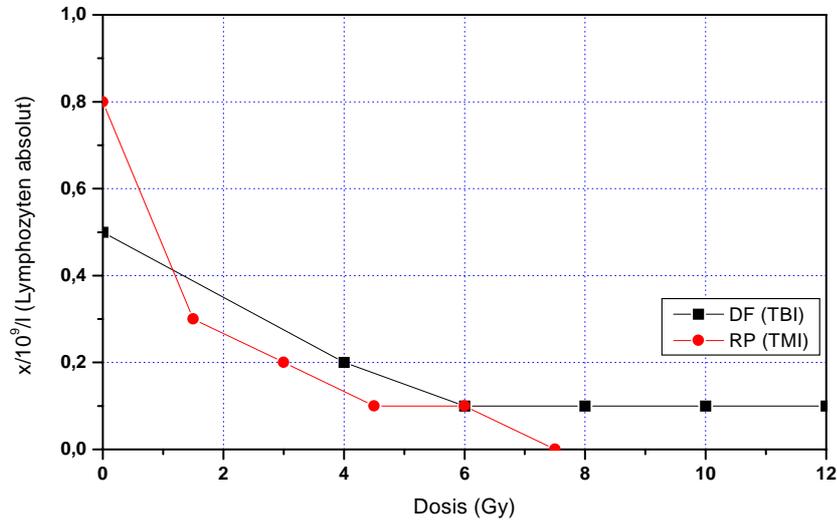


Abbildung 3.13: Verhalten der Lymphozytenpopulation im peripheren Blut, dargestellt für zwei Patientinnen (DF und RP) während einer fraktionierten Ganzkörperbestrahlung (TBI) bzw. Ganzknochenmarkbestrahlung (TMI)

te ein gegensätzliches Verhalten. Bis zum Erreichen einer Gesamtkörperdosis von 4 Gy bzw. 3 Gy kam es zum starken Lymphozytenabfall (Abb.3.13). Danach bestand bei einer Patientin (DF) ab 6 Gy eine konstante Anzahl Lymphozyten (Abfall von  $0,8 \times 10^9/l$  auf  $0,1 \times 10^9/l = 12,5\%$ ). Bei der anderen Patientin (RP) war bei einer Gesamtkörperdosis von 7,5 Gy die Lymphozytenzahl praktisch nicht mehr meßbar (Abfall von  $0,5 \times 10^9/l$  auf  $0 \times 10^9/l = 0\%$ ). Eine Unterteilung in die Subpopulationen der Lymphozyten war mit dem uns zur Verfügung stehendem Gerät nicht möglich.

### 3.3.2 DNS-Basalschaden

Vor jeder Bestrahlungsfraction wurde jedem Patienten Blut für In-vitro-Untersuchungen entnommen. Aus diesen Blutproben erfolgte die Bestimmung des DNS-Basalschadens vor jeder erneuten Bestrahlung. Vorherige Chemotherapien nahmen vor der allerersten Fraction auf diesen Wert Einfluß. Die Patientin mit Multiplen Myelom wurde zwei Monate zuvor an mehreren Wirbelsegmenten bestrahlt. Die vorher applizierte Dosis beeinflusste somit den gemessenen DNS-Basalschaden. In jeden weiteren Meßwert flossen die Effekte der vorausgegangenen Bestrahlungsfraction und des Reparaturvermögens des Zellsystems unter der Ganzkörper- bzw. Ganzknochenmarkbestrahlung ein.

Bei allen Patienten bestand zwischen dem Ausgangswert bei 0 Gy und dem Meßwert vor der letzten Fraction (nach 10 Gy bzw. 7,5 Gy) eine deutliche Differenz (Abb.3.14). Der Ausgangsschaden hatte zugenommen (von 12% auf 25% DNS

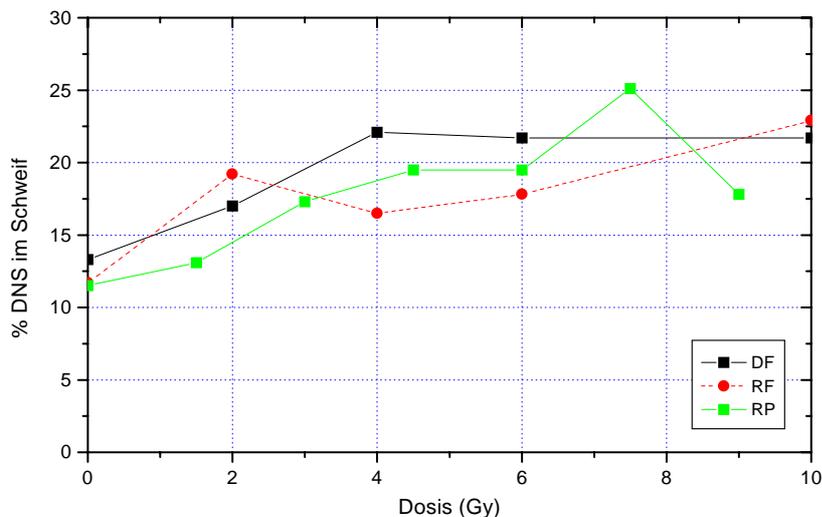


Abbildung 3.14: DNS-Basalschädigung vor jeder erneuten Bestrahlung. Die Kurven für alle drei Patienten sind zusammen dargestellt. (DF, RF, RP - Patienteninitialen)

im Schweiß). Dabei war nur bei einer Patientin (DF) eine Plateauphase ab 4 Gy Gesamtkörperdosis zu verzeichnen. Bei den anderen Patienten nahm das gemessene Schadensausmaß vor jeder Bestrahlungsfraction zu.

### 3.3.3 Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Die vor jeder Bestrahlung gewonnenen Blutproben wurden nach Gelpräparation in-vitro bestrahlt. Für alle Patienten war die Wirkung dosisabhängig. Die Dosis-Wirkungs-Kurven wiesen einen ähnlichen Verlauf auf. Offensichtlich bestand zwischen der vorher applizierten In-vivo-Bestrahlungsdosis und dem Kurvenverlauf ein Zusammenhang. Die Kurven erschienen parallel zueinander verschoben. Es wurde in-vitro nur bis zu einer Einzeldosis von 4 Gy bestrahlt. Bei größeren Bestrahlungsdosen konnte der DNS-Schaden nicht mehr bestimmt werden. Die maximal meßba-

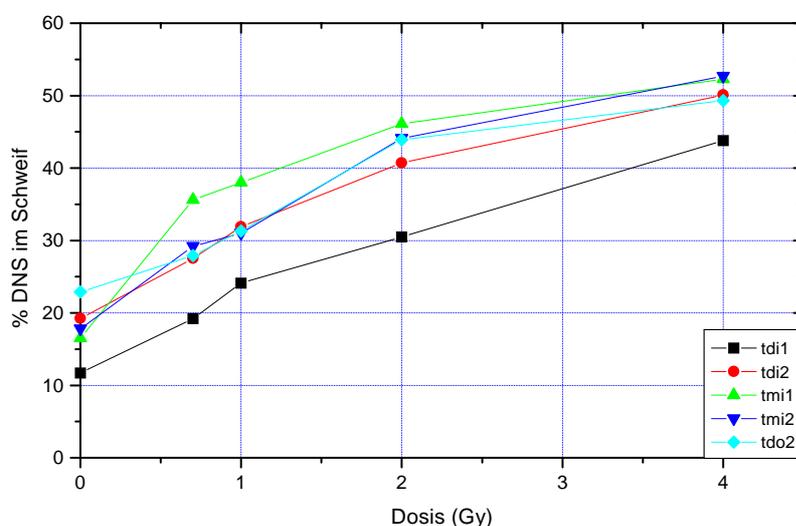


Abbildung 3.15: *In-vitro-Dosis-Wirkungs-Kurven des Patienten RF (TBI) - Die Blutentnahme erfolgte vor jeder erneuten Bestrahlungsfraction. (tdi 1, tdi 2, tmi 1, tmi 2, tdo2 - Messungen mit 0, 2, 4, 6 und 10 Gy Vorbelastung; die fünfte Messung fehlt, da die Objektträger nicht auswertbar waren)*

re Schweiffluoreszenzintensität betrug über alle Kurven für Patient RF 43 - 53% (Abb.3.15), für die Patientin DF 41 - 50% (Abb.3.16) und für die Patientin RP 33 - 58% (Abb.3.17). Die Patientin RP erhielt zur Radio- eine Chemotherapie mit Busulfan. Die zuletzt aufgenommene Kurve (*tdona*) dieser Patientin vor der letzten Bestrahlungsfraction zeigte starke Abweichungen zu den anderen Kurven dieser Patientin wie auch zu denen der beiden anderen Patienten. Die fünf anderen Kurven (RP) für sich allein betrachtet, ergaben ein ähnliches Bild wie bei den anderen Patienten. Die Spannbreite des DNS-Schweifanteils würde dann 33 - 45% umfassen.

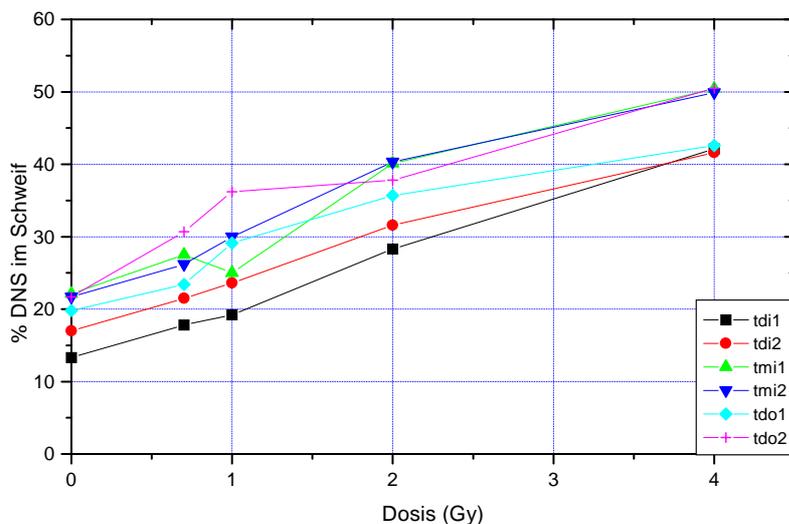


Abbildung 3.16: *In-vitro-Dosis-Wirkungs-Kurven des Patienten DF (TBI) - Die Blutentnahme erfolgte vor jeder erneuten Bestrahlungsfraktion. (tdi 1, tdi 2, tmi 1, tmi 2, tdo 1, tdo2 - Messungen mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy Vorbelastung)*

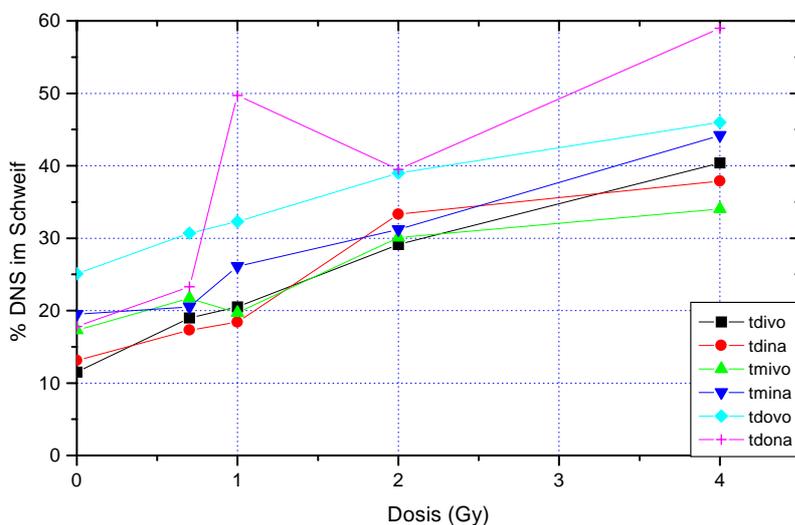


Abbildung 3.17: *In-vitro-Dosis-Wirkungs-Kurven des Patienten RP (TMI) - Die Blutentnahme erfolgte vor jeder erneuten Bestrahlungsfraktion. Diese Patientin wurde ganzknochenmarkbestrahlt. (tdivo, tdina, tmivo, tmina, tdovo, tdona - Messungen mit 0; 1,5; 3; 4,5; 6 und 7,5 Gy Vorbelastung)*

### 3.3.4 Reparaturuntersuchungen

Die Reparaturuntersuchungen wurden in-vitro und in-vivo durchgeführt. Als In-vivo-Reparatur wird hier der Vorgang im Patienten bezeichnet, wobei die sofort nach In-vivo-Bestrahlung entnommene Blutprobe für die In-vitro-Reparaturexperimente diente. Die Leukozyten wurden mit Nährmedium im Gel präpariert inkubiert. Das Abstoppen des Reparaturvorganges der In-vitro-Leukozyten erfolgte zum selben Zeitpunkt wie die nächste Blutentnahme. Damit galten für In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen die selben Reparaturzeiten. Das In-vivo-Reparaturverhalten jedes einzelnen Patienten entsprach nahezu dem In-vitro-Reparaturverhalten. Bei den zwei NHL-Patienten waren in beiden Versuchsarmen Effekte der langsamen und schnellen Reparatur sichtbar (Abb.3.18, 3.19 sowie Abb.3.20, 3.21). Bei der dritten Patientin (RP) (Abb.3.22, 3.23) verhielten sich die individuellen In-vivo- und In-vitro-Kurven sehr ähnlich. Aber es bestanden deutliche Unterschiede der Kurven zu denen der anderen Patienten. Alle dargestellten Reparaturkurven lagen dicht beieinander. Hierbei war kaum eine schnelle Reparaturkomponente meßbar. Nach Ende der 30-minütigen Reparaturzeit nahm ab einer gesamt in-vivo applizierten Dosis von 6 Gy der gemessene DNS-Anteil im Schweif zu. Diese Effekte gelten sowohl für In-vitro- als auch für In-vivo-Untersuchungen, wobei der beschriebene Effekt in-vivo stärker war.

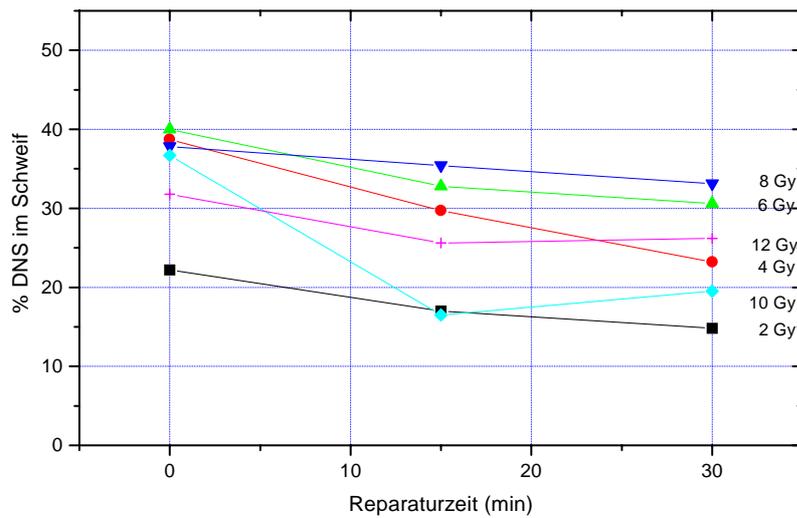


Abbildung 3.18: *In-vitro-Reparaturverhalten der Patientin DF (TBI). Die Blutproben wurden zum Ende der In-vivo-Bestrahlung entnommen und dann für 15 bzw. 30 Minuten bei 37°C in Agarosegelen präpariert inkubiert. Parallel dazu wurden der Patientin nach 15 bzw. 30 Minuten Blutproben zur Kontrolle des In-vivo-Reparaturverhaltens entnommen.*

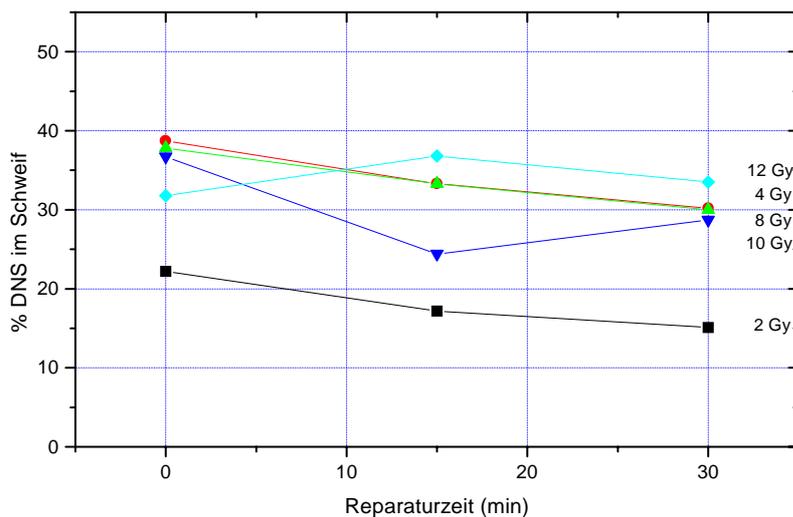


Abbildung 3.19: *In-vivo-Reparaturverhalten der Patientin DF (TBI). Die Blutproben wurden jeweils 15 bzw. 30 Minuten nach Abschluß der In-vivo-Bestrahlung entnommen.*

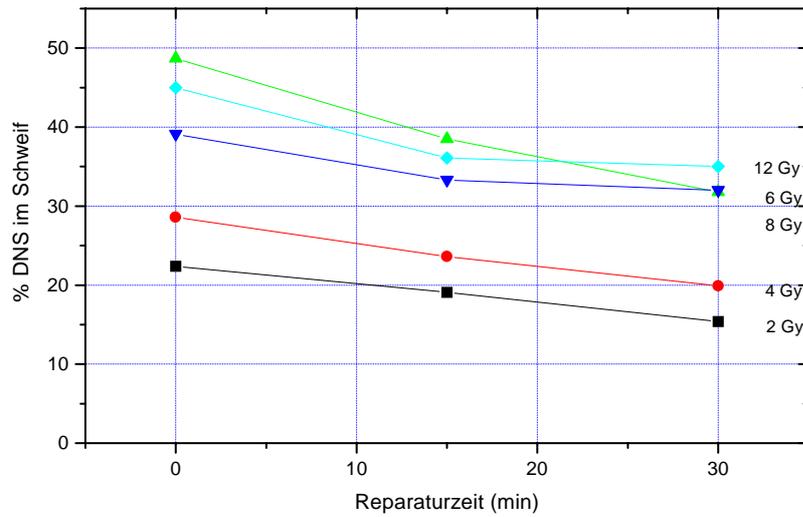


Abbildung 3.20: *In-vitro-Reparaturverhalten des Patienten RF (TBI). Die Blutprobe wurde sofort nach In-vivo-Bestrahlung entnommen. Die Reparatur erfolgte im Nährmedium für 15 bzw. 30 Minuten im Inkubator.*

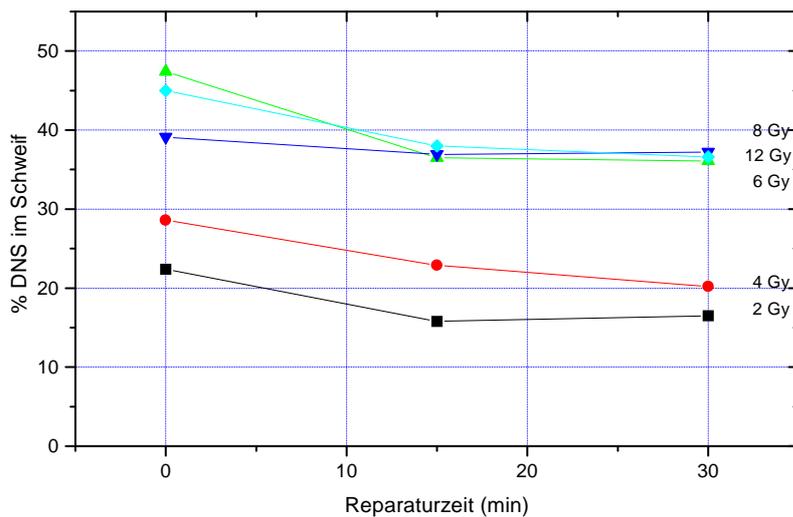


Abbildung 3.21: *In-vivo-Reparaturverhalten des Patienten RF (TBI). Die Blutproben wurden 15 bzw. 30 Minuten nach Abschluß der In-vivo-Bestrahlung entnommen.*

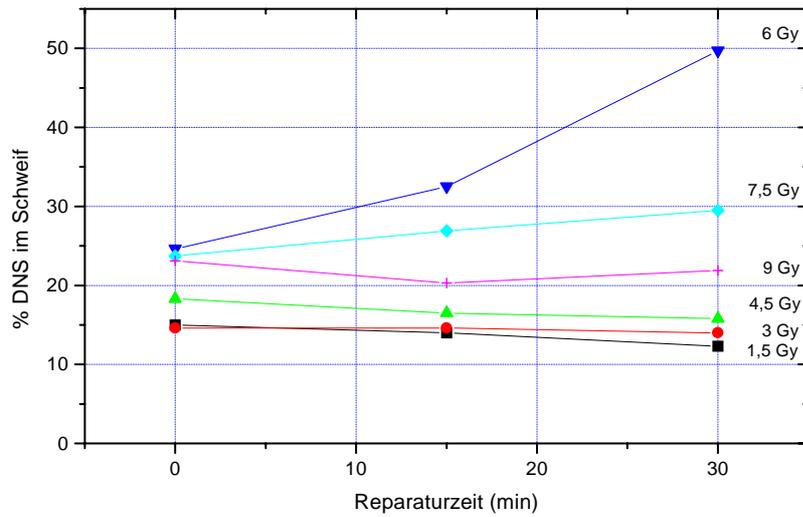


Abbildung 3.22: *In-vitro-Reparaturverhalten der Patientin RP (TMI). Die Blutprobe wurde sofort nach In-vivo-Bestrahlung entnommen. Die Reparatur erfolgte im Nährmedium für 15 bzw. 30 Minuten im Inkubator.*

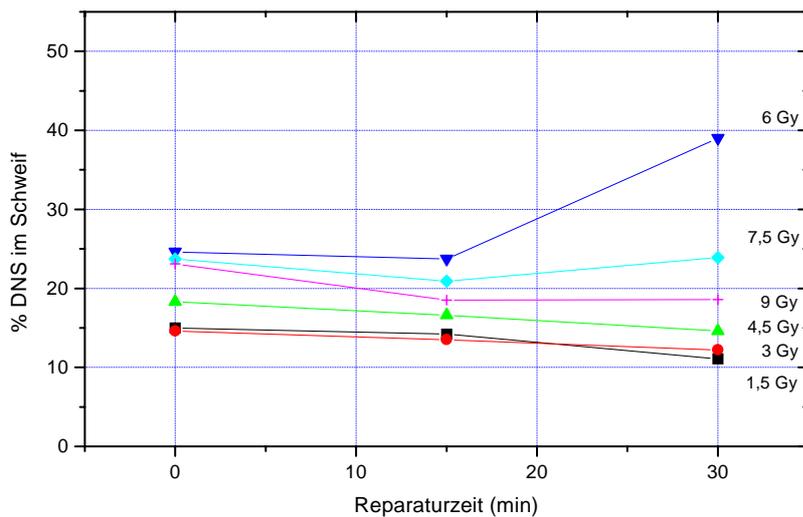


Abbildung 3.23: *In-vivo-Reparaturverhalten der Patientin RP (TMI). Die Blutproben wurden 15 bzw. 30 Minuten nach Abschluß der In-vivo-Bestrahlung entnommen.*

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Sarkomzellen

#### 4.1.1 Vergleich der beiden Comet-Assay-Protokolle

Wie aus Untersuchungen von Olive et al. bekannt, reagieren Zellen, die sich im Nährmedium befinden, mit einer schnelleren und korrekteren Wiederverknüpfung von DNS-Bruchstellen als Zellen z.B. in PBS [47]. Mit unseren zwei verschiedenen Comet-Assay-Präparationstechniken konnten wir das angeführte Argument untermauern. Bei der Bestrahlung in Eppendorf-Röhrchen mit sofort angeschlossenenem Gelauftrag wurden bei der Messung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen deutlich geringere Fluoreszenzintensitäten als bei der ursprünglichen Gelpräparation und In-Gel-Bestrahlung gemessen [46]. Dieser Effekt wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet. Olive et al. gehen davon aus, daß bereits vor der Bestrahlung in Agarose präparierte DNS (Zellen) wanderungsfähiger ist [43]. Die beiden Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 können mit beiden Verfahren untersucht werden. Bestrahlt man die Tumorzellen hingegen in Eppendorf-Gefäßen und trägt nachfolgend in Agarose-Gelen auf, entsteht eine Zeitlücke infolge der Präparationstechnik von ca. 10 Minuten, in welcher Reparaturprozesse ablaufen. Dies ist jedoch die Zeitspanne, in der der Hauptteil der Reparatur geleistet wird. Somit ist diese Auftragstechnik für die untersuchten Weichteilsarkomzellen ungeeignet. Es bleibt zu vermuten, daß damit keine vollständigen Dosis-Wirkungs-Beziehungen darstellbar sind. Der Reparatureffekt nimmt zu. Unter der Bestrahlung werden bereits gerade ausgelöste Schäden repariert. Somit addieren sich bei der Protokoll-Variante I die Reparatureffekte. Trotz schnellstmöglicher Präparation unmittelbar nach der Bestrahlung in der Protokoll-

Variante I konnte für die beiden p53-mutierten Zelllinien im Vergleich zur Protokoll-Variante II ein deutlich vermindertes DNS-Schadensmaß ermittelt werden. Der hierbei gemessene Initialschaden läßt keine direkte Beurteilung unmittelbar nach der Bestrahlung zu, da während der Präparation Reparaturvorgänge nicht vollständig inhibiert werden können. Die gemessene DNS-Schädigung stellt somit eine Funktion des Basalschadens, des gesetzten Initialschadens und der schon abgelaufenen Reparaturprozesse innerhalb der ersten 10 Minuten dar.

Die sehr empfindliche Zelllinie SAOS-2 konnte nur in Eppendorf-Gefäßen bestrahlt werden. Bei der Gelpräparation war trotz gleich aufgetragener Zellzahl nur ein schwaches Fluoreszenzsignal zu verzeichnen. Im Vergleich zu Literaturdaten kann man bei der SAOS-2 von einer schnellen Absterberate aufgrund verschiedener Faktoren ausgehen. Bei genauerer Betrachtung fiel ein deutlich erhöhter Anteil abnormer Kometen auf. Allerdings konnte keine Quantifizierung vorgenommen werden. Viele Kometen zeigten ein schwaches Fluoreszenzsignal, andere wiederum fielen durch eine Teilung in Kopf und Schweif auf. Dieses Erscheinungsbild deutet auf apoptotische Zellen hin [42, 44, 48, 49]. Somit scheint die Zelllinie SAOS-2 besonders empfindlich gegenüber Strahlung im Vergleich zu den beiden anderen Sarkomzelllinien zu sein. Wahrscheinlich liegt eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der herkömmlichen *Comet-Assay*-Präparationstechnik und den veränderten Ernährungsbedingungen im Gel zugrunde. US 8-93 und LMS 6-93 erscheinen gegenüber diesen Einflüssen relativ stabil. Auch von anderen Gruppen konnten Unterschiede im Initialschaden von humanen Tumorzellkulturen gezeigt werden. So variierten T47D-B1 und RT-112 in Experimenten von Ruiz de Almodovar et al. im Ausmaß des Initialschadens für Doppelstrangbrüche. Die Beurteilung der Fragmentgröße der Doppelstrangbrüche ergab Hinweise darauf, daß eine Zellspezifität in der Fragmentation nach Einwirkung der Strahlung besteht [59]. Eine Erklärungsmöglichkeit für diesen Effekt liegt in Unterschieden der Chromatinstruktur [16]. Müller et al. konnten anhand von *Comet-Assay*-Experimenten keine Unterschiede im Initialschaden für drei Tumorzellkulturen finden (MeWo, PECA 4451 und PECA 4197). Die weiteren Ergebnisse zeigen, daß dennoch Unterschiede in der Reparaturkapazität bestanden. Alle drei Zelllinien konnten zusätzlich im Koloniebildungstest hinsichtlich ihrer Radiosensitivität differenziert werden [37].

Anhand der Breite des Schulteranteils kann man auf die Möglichkeit der Reparatur von DNS-Schäden schließen. US 8-93 und LMS 6-93 zeigen beide eine Schul-

terkurve. Allerdings sind bei den *Comet-Assay*-Experimenten (Protokoll-Variante I) nur die Reparaturprozesse beteiligt, welche bereits unter der Bestrahlung und unmittelbar danach (10 Minuten) ablaufen. Aus diesen Dosis-Wirkungs-Kurven und Reparaturuntersuchungen von max. 120 Minuten können keine Aussagen zur Langzeitreparatur (über 2 Wochen) getroffen werden. Dazu ist ein Koloniebildungstest nötig. Für die Zelllinie SAOS-2 hingegen findet man einen nahezu linearen Kurvenverlauf. Aus der Analyse dieser Kurve kann man auf eine strahlenempfindliche Zellkultur schließen. Es überwiegt eindeutig der  $\alpha$ -Anteil des linear-quadratischen Modells, welcher irreparable Läsionen beschreibt. Sowohl mit dem *Comet-Assay* als auch dem Koloniebildungstest war eine Einordnung aller drei Zelllinien in der Abfolge ihrer Strahlenempfindlichkeit möglich. Für die Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 konnten anhand des Schadensmodells von Gerlach [25]  $\alpha$ -Werte aus den *Comet-Assay*-Ergebnissen berechnet werden. Im Vergleich zu den von Bache [4] aus den Koloniebildungstests berechneten Werten zeigte sich, daß diese mit den  $\alpha$ -Werten für das *Comet-Assay* übereinstimmen.

#### **4.1.2 Zellzyklusabhängigkeit und Einfluß der DNS-Struktur**

Die hier verwendeten Zellkulturen wurden alle nicht synchronisiert. Das heißt, es lag eine Verteilung auf alle Zellzyklusphasen vor. Da aber jede Zellzyklusphase eigene Charakteristika der Strahlenempfindlichkeit aufweist, sei im Folgenden auf Unterschiede hingewiesen. Durch die Zellzyklusverteilung existieren verschiedene Chromatinkonformationen, welche Einfluß auf die Strahlenempfindlichkeit nehmen. Die genomische DNS in lebenden Zellen ist immer mit Proteinen assoziiert. Dabei liegt die DNS in hochkondensierter Form als Chromatin vor. Das Verteilungsmuster der DNS im Zellkern ist an die spezifische Funktion bestimmter Gene gekoppelt. Die sog. Wächterfunktionen ("housekeeping-function") und zelltypische Gensequenzen sind dabei in der Kernmatrix verankert. Man unterscheidet Eu- und Heterochromatin. Welche Konformation angenommen wird, ist abhängig vom Aktivitätszustand einer Zelle. In stoffwechselaktiven und proliferierenden Zellen liegt das Chromatin als Heterochromatin vor. Der Kompaktierungsstatus des Moleküls variiert in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase. Stark kondensiertes - also dicht gepacktes Chromatin- besitzt eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit [65]. Die Regulation der Kompaktierung wird wahrscheinlich durch Histon-Kinasen und Phosphatasen ausgeführt [16]. Aktives Euchromatin wirkt eher verstärkend auf die Ausprägung von radiogen induzier-

ten DNS-Schäden. Für Heterochromatin wurde bewiesen, daß der initiale Chromatinschaden unmittelbar nach Bestrahlung geringer ausgeprägt ist. Außerdem wurde gezeigt, daß die Reparatur bei dieser Konfiguration langsamer abläuft [53]. In den meisten Zellen liegt vorwiegend inaktives Heterochromatin vor, damit werden bei Vorliegen von DNS-Läsionen die Reparaturenzyme auf euchromatinreiche Bezirke konzentriert. Für UV-Strahlung und Chemikalieneinwirkung wurde nachgewiesen, daß Reparaturvorgänge in transkriptionsaktiven Genombereichen schneller ablaufen [53]. Unterschiede in der Chromatinkonfiguration bestehen in der Methylierung der DNS, in der Acetylierung von Histonen sowie in der Protein-DNS-Distanz und in der Lokalisation von Enzymaktivitäten an der Kernmatrix. Auf diesem Weg wird auch die DNS-Läsionsverteilung beeinflusst. Die Schadenserkenkung und Zugänglichkeit für Reparaturenzyme spielen eine große Rolle. Aber eine meßbar verbesserte Reparatur erhöht nicht automatisch auch das Überleben [47, 48]. Ca. 6% aller Einzelstrangbrüche sind in der Umgebung von 0,1 - 2 kB mit einem weiteren Einzelstrangbruch vergesellschaftet. Expandiertes Chromatin oder Chromatin, dem die Histone entfernt wurden, weist eine deutliche Zunahme der DNS-Einzelstrangbrüche auf.

Auf dem Weg einer Teilchenspur ("tracks") können hintereinander durch direkte und indirekte Auswirkung verschiedene Schädigungen induziert werden. Zellen mit hochkondensiertem Chromatin unterliegen vorwiegend der sog. "single-hit"-Inaktivierung. Das Hauptkennzeichen der zugehörigen Dosis-Wirkungs-Beziehungen besteht in einer deutlich ausgeprägten  $\alpha$ -Komponente (vgl. Linear-Quadratisches-Modell [60]). Das heißt, es treten hauptsächlich letale Ereignisse ein. Liegt die DNS im Chromatin hingegen in dispergierter Form vor, besteht eine geringere Trefferwahrscheinlichkeit eines "tracks" [40]. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß Gene, die für die Regulierung des DNS-Kompaktierungsstatus codieren, mit für die Ausprägung der individuellen intrinsischen Strahlenempfindlichkeit verantwortlich sind. Zellen, die einen genetischen Defekt besitzen, welcher eine Kompaktierung der DNS auslöst, müßten somit sehr empfindlich gegenüber Strahlung sein [16].

Die Zellzyklusposition hat einen Einfluß auf den DNS-Schaden [6]. Es ist bekannt, daß Zellen in der frühen G1-Phase relativ strahlenresistent sind [40]. Zum Ende der G1-Phase existiert ein erhöhter Anteil kompaktierten Chromatins. Am Übergang von der G1- zur S-Phase erwiesen sich verschiedene Zellarten als hochempfindlich gegenüber Bestrahlung [16]. Im Verlauf der S-Phase kann man in den

Zellen eine Zunahme der Strahlenresistenz beobachten [10]. Kulturzellen, welche sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der Mitose befinden, erscheinen alle gleich empfindlich. Während der Mitose besteht ein hoher Kompaktierungsstatus der DNS im Chromatin. Die dicht gepackte DNS erweist sich als gutes Ziel der Strahlung. S-Phase-Zellen verfügen bereits im Rahmen der Replikation über Einzelstrangbrüche. Außerdem führt die Ausbildung von Replikationsstrukturen in der DNS in der späten G1-, frühen S-Phase zu einer behinderten Wanderungsfähigkeit der DNS in der Elektrophorese [43]. Kulturzellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in G1 befinden, reparieren offensichtlich schneller. Dabei kann die Reparaturhalbwertszeit der schnellen Phase nur 4-8 Minuten betragen. Unterschiede in der Zellreaktion bei Tumorzellen auf Strahlung haben ihre Ursache darin, wie lange sich eine Tumorzelle in G1 befunden hat. In nicht-proliferierenden Zellen werden Reparaturenzyme in ihrer Aktivität vermindert. Die Aktivität schneller Reparaturmechanismen ist vor allem in sich teilenden Zellen von Bedeutung. Die langsame Komponente der Einzelstrangbruch-Wiederverknüpfung ("Rejoining") weist eine Halbwertszeit von ca. 2 - 4 Stunden auf. Der Anteil wiederverknüpfter Einzelstrangbrüche ist oft größer als erwartet. Die Reparaturkinetik verläuft exponentiell.

### **4.1.3 Einfluß des p53-Status auf die Strahlenempfindlichkeit**

Untersuchungen von Tumorzellen bezüglich ihrer Radiosensitivität beziehen seit mehreren Jahren das Tumorsuppressorgen p53 (Abb. 4.1 ) ein. Ein Maß für die Wirksamkeit von Strahlung stellen in vielen Fällen die Zellüberlebensfraktion bei 2 Gy ( $SF_2$ ) und der Apoptoseindex dar. Dabei erscheint es vor allem interessant, auf welchem Weg und in welchem Ausmaß sich diese Effekte modifizieren lassen. Wie in einer Arbeit von Bache et al. an den hier ebenfalls untersuchten WTS-Zelllinien gezeigt, existieren p53-abhängige und p53-unabhängige Apoptosewege [3]. In Radiosensitivierungsversuchen mit dem Methylxanthin Koffein wurden konträre Ergebnisse gefunden. Die Ergebnisse von Bache et al. aus den herkömmlichen Strahlenempfindlichkeitstests zeigen, daß für die beiden Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 über Koffein eine Sensibilisierung gegenüber Strahlung auszulösen ist [5]. Beide Zelllinien wurden nach Koffeinbehandlung (1 mM Koffein über 24 Stunden) mit dem *Comet-Assay* charakterisiert. Der Sensibilisierungseffekt für p53-mutierte Weichteilsarkomlinien konnte auch mit dem *Comet-Assay* festgestellt werden. Eine Sensibilisierung gegenüber radioaktiver Strahlung bei zwei Linien von Ratten-Dottersack-Tumoren

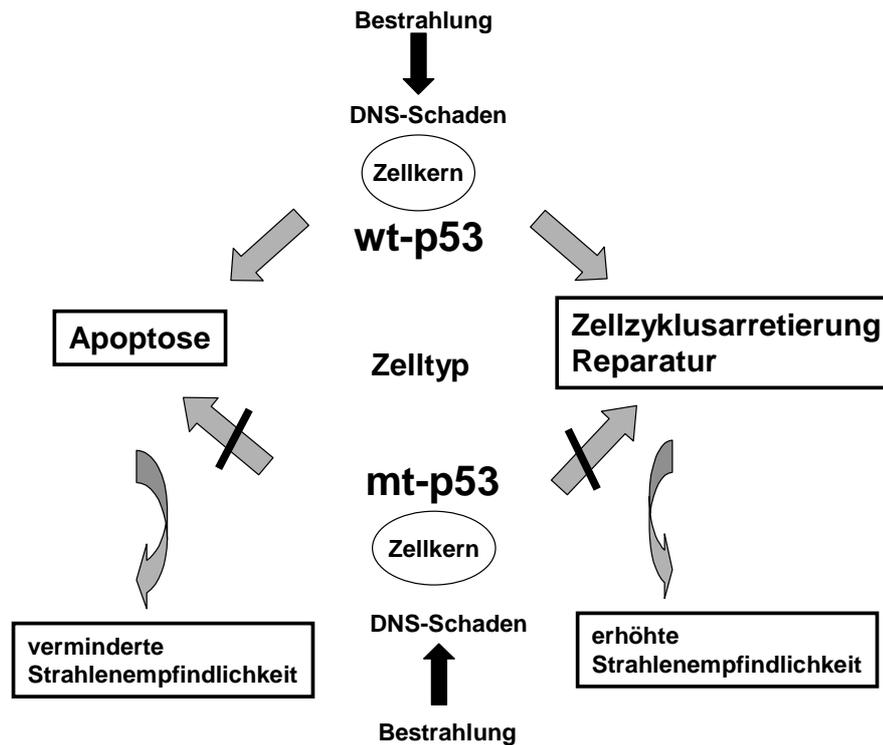


Abbildung 4.1: Schema der p53-Funktion in Abhängigkeit vom p53-Status (Wildtyp oder Mutation) und die Auswirkungen auf das Zellsystem - modifiziert nach O'Connor 1997 [4, 41]

mit p53-Mutation konnte unter Koffeininkubation ebenfalls ausgelöst werden [26]. An drei Harnblasenkarzinom-Zelllinien wurde von Ribeiro et al. diese These aber nicht unterstützt [57]. In weiteren Untersuchungen von Bache et al. wurde gezeigt, daß der nach Strahleneinwirkung ausgelöste G2/M-Block sowohl über p53-abhängige und p53-unabhängige Wege funktioniert [3].

#### 4.1.4 Reparaturuntersuchungen

Untersuchungen zur Reparaturfähigkeit von Weichteilsarkomen wurden nur an den zwei Linien LMS 6-93 und US 8-93 durchgeführt. In der Auswertung beider Zelllinien konnte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität im Schweif gemessen werden. Unter der Voraussetzung, daß sich infolge von Reparaturvorgängen intakte DNS hauptsächlich im Kometenkopf befindet und sich anfärben läßt, muß gleichzeitig eine Abnahme der Fluoreszenzintensität im Schweif nachweisbar sein. In beiden Zelllinien erfolgen nach Strahlungseinwirkung Reparaturvorgänge innerhalb kurzer Zeit.

Diese Fähigkeit ist aber nicht gleich ausgeprägt. So repariert die Linie US 8-93 trotz eines deutlich höheren Initialschadens einen größeren Anteil geschädigter DNS im gleichen Zeitraum wie LMS 6-93. Für beide Zellkulturen wurde eine Abnahme der Fluoreszenzintensität des Kometenschweifes und Zunahme der Fluoreszenzintensität des Kometenkopfes über das genannte Reparaturzeitintervall ermittelt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Gruppen bezüglich verschiedener Tumorzelllinien gefunden [7, 37].

Betrachtet man das Verhalten des Residualschadens über 120 Minuten, so ist für US 8-93 und LMS 6-93 ein gegensätzlicher Trend zu verzeichnen. Mit steigender Strahlendosis nimmt in der Zelllinie US 8-93 der Residualschaden über 120 Minuten ab. Dagegen steigt bei den Untersuchungen der Zelllinie LMS 6-93 der Residualschaden an. Der minimal erreichte Residualschaden beträgt bei 8 Gy 30%. Bei allen übrigen Strahlendosen sind nach 120 Minuten Reparaturzeit höhere Residualschäden festzustellen. Die Werte hierfür liegen zwischen 40-50%. Man kann in diesen Fällen postulieren, daß eine bestimmte Strahlendosis appliziert werden muß, um Reparaturgene "anzuschalten" bzw. Reparaturproteine zu aktivieren. In Arbeiten zur adaptiven Strahlenreaktion konnte von Wojcik et al. gezeigt werden, daß nach Vorbestrahlung mit kleiner Dosis von 0,5 Gy nach einer zweiten Bestrahlung eine deutlich bessere Reparatur ausgelöst werden kann [72, 73].

Die Reparaturkurven beider Zelllinien zeigten einen biphasischen Verlauf (Phase I - schnelle Reparatur und Phase II - langsame Reparatur). Es fiel auf, daß die Zelllinie LMS 6-93 im *Comet-Assay* eine verminderte Reparaturkinetik zeigte. Allerdings fand sich unsere Annahme einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit für diese Linie im Koloniebildungstest nicht bestätigt. Möglicherweise ist für dieses Phänomen ein Unterschied in der Reparaturqualität zwischen US 8-93 und LMS 6-93 zu suchen [4, 25, 54]. Die Reparaturgeschwindigkeit kann aus der Anpassung an die dargestellten Reparaturkurven berechnet werden. Während der ersten 30 Minuten ist für beide Zelllinien kein Unterschied bezüglich der Reparaturgeschwindigkeit auszumachen. In der hier zuletzt untersuchten Reparaturphase von 120 Minuten ist anhand der näherungsweise berechneten Reparaturgeschwindigkeiten zu sehen, daß die Zelllinie LMS 6-93 im Dosisbereich von 1 bis 4 Gy ungefähr die gleiche Reparaturgeschwindigkeit aufweist. Bei Bestrahlung mit 8 bzw. 10 Gy wurde eine höhere Geschwindigkeit berechnet. Für die Zelllinie US 8-93 wurden ähnliche Reparaturgeschwindigkeiten ermittelt. Hier war kein Unterschied zwischen den einzelnen Bestrahlungsdosen und der induzier-

ten Reparatur auszumachen. Gestützt auf die Ergebnisse des Koloniebildungstests scheint die Reparaturgeschwindigkeit keinen Einfluß auf die Strahlenempfindlichkeit zu haben.

#### 4.1.5 Koffeineinfluß auf den DNS-Schaden

Nachdem bereits in verschiedenen Experimenten [4,5] bezüglich des Koffeineinflusses eine Radiosensibilisierung für die Weichteilsarkomzellkulturen nachgewiesen werden konnte, sollte überprüft werden, ob mit den *Comet-Assay* in kürzerer Zeit ein Sensibilisierungseffekt detektiert werden kann. Die Radiosensibilisierung mit Koffein basiert auf direkten und indirekten Effekten an der DNS. Von Bache et al. konnte gezeigt werden, daß Zellen mit defekten p53-Genstatus (US 8-93 und LMS 6-93) nach Koffeinbehandlung viel stärker auf eine Bestrahlung ansprachen. Dabei wurden die Zellen mit 0,5 - 5 mM Koffein inkubiert. Bereits bei einer Dosis von 1 mM Koffein konnte eine Potenzierung des DNS-schädigenden Effektes der Strahlung gezeigt werden. Aus diesem Grund erfolgte die Inkubation der Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 für 24 Stunden mit 1 mM Koffein für die *Comet-Assay*-Experimente. Die Bestrahlung der Zellen fand nach der Protokoll-Variante I statt, anschließend wurden die Zellen in Agarose-Gel präpariert. Die Messung des Initialschadens für die Zelllinie US 8-93 ergab nach Koffeininkubation einen deutlich höheren Schweifanteil als für die Zelllinie LMS 6-93. Nach 60 Minuten Reparaturzeit scheint dennoch ein Großteil des Initialschadens repariert zu sein. In den Untersuchungen von Bache et al. konnten in Westernblotanalysen für P53 und P21/Waf1 nach Bestrahlung und Koffeininkubation keine erhöhten Proteinexpressionen bestimmt werden [4]. Aus diesem Grund ist anzunehmen, daß die Strahlensensibilisierung über einen p53-unabhängigen Weg induziert wird. Dennoch tritt eine Verstärkung des Strahleneffektes vor allem in p53 mutierten Zellen auf. In ca. 50% aller Tumoren liegen Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 vor. Aus Experimenten von Bristow et al. ist bekannt, daß Zellen mit p53-Defekt gerade dann radioresistent sind, wenn sie die Fähigkeit zur schnellen Reparatur besitzen [11, 12]. Koffein führt zur Potenzierung des Strahleneffektes, wenn durch die Bestrahlung ein langdauernder G2/M-Block ausgelöst wird und zusätzlich eine Hemmung der Reparaturprozesse stattfindet. Koffein wirkt nicht nur indirekt über die Modulation von Proteinen auf die Zelle, sondern es interagiert mit der DNS. Dabei bindet Koffein an Einzelstrang-DNS. Es kann zudem in die DNS eingebaut werden. Auf diesem Weg wird die DNS-Konformation verändert, und Re-

paraturenzyme können nicht ungehindert an die DNS binden. Die DNS-Reparatur wird vor allem durch die Inhibition der Phosphodiesterase beeinflusst [32]. Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) kann nicht mehr in Adenosinmonophosphat (AMP) umgewandelt werden. Durch den Wegfall des sog. "second messenger" in der Signalkaskade der Zelle treten Störungen im Ablauf des Zellzyklus auf. Infolge des aufgehobenen G2/M-Blocks - durch Verhinderung der p34-Phosphorylierung - wird eine Radiosensibilisierung ausgelöst. In letzter Zeit konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, daß gerade in p53-mutierten Zellen über den Einsatz von Koffein eine Radiosensibilisierung ausgelöst wird [5, 56]. Durch Koffein kann die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase spezifisch inhibiert werden. Damit werden Zellproteine nicht mehr ADP-ribosyliert. Störungen in der Zellproliferation, Differenzierung, Chromatin-Kondensation und in der Aktivierung von Reparaturprozessen (Ligasefunktion, Exzisionsreparatur) sind die Folge [7]. In Untersuchungen an zweizelligen Mäuse-Embryonen konnten Bauch et al. nach 30 und 120 Minuten Inkubation mit 2 mM Koffein und Bestrahlung mit 2 Gy keine Anhebung des Basalschadens - wie in unseren Experimenten für die Sarkomzelllinien US 8-93 und LMS 6-93 gezeigt - verzeichnen [7]. Erst bei einer Koffeinkonzentration von 5 mM war nach 120 Minuten Inkubation eine Zunahme des Basalschadens zu messen. Ebenso konnte bei 2 mM Koffeinzusatz und Bestrahlung nach 120 Minuten Reparaturzeit ein deutlich erhöhter Residualschaden gemessen werden. Ähnliche Ergebnisse liegen von dieser Gruppe bezüglich der Reparaturmodulation von humanen Tumorzellkulturen (MeWo, 4197, 4451) vor [7].

## 4.2 Patienten mit akuten und späten radiogen bedingten Nebenwirkungen

Anhand von zwei Patientenkollektiven (akute und späte Nebenwirkungen) und einer Kontrollgruppe sollte überprüft werden, inwieweit es mit der *Comet-Assay*-Methode möglich ist, Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit von Leukozyten zu bestimmen. In vier Studien aus der Literatur [14, 24, 27, 70] konnte ein Zusammenhang zwischen der In-vitro-Strahlenempfindlichkeit von Fibroblasten und der Normalgewebsreaktion gezeigt werden. Dabei wurden hauptsächlich sog. "DNA damage"-Tests angewandt. Diese Ergebnisse konnten in einer neueren Studie [52] nicht bestätigt werden. Allerdings wurde in dieser Untersuchung nur das klonogene Überleben zur

Komplikationsrate ins Verhältnis gestellt, womit mögliche Korrelationen zwischen DNS-Schaden und Spätnebenwirkungshäufigkeit nicht untersucht wurden. Andere Arbeitsgruppen konnten Korrelationen zwischen Lymphozyten-Strahlenreaktion und Strahlentherapie-Nebenwirkungen zeigen [2, 20, 21, 31]. Untersuchungen an gesunden hämatopoetischen Zellen von acht Probanden und leukämischen Lymphozyten von 36 CLL-Patienten ergaben, daß bei einer Strahlendosis von 2,4 als auch 5,4 Gy der DNS-Schaden nahezu vollständig in allen überlebenden Populationen repariert wurde. Die strahleninduzierte Zytotoxizität korrelierte hier offensichtlich nicht mit der Ausbildung von DNS-Strangbrüchen und dem Reparaturverhalten. Die Autoren dieser Arbeit gelangen zu dem Schluß, daß andere Faktoren als Strangbrüche und Reparaturkapazität für interindividuelle Unterschiede in der Strahlenreaktion verantwortlich sind [38].

#### 4.2.1 Dosis-Wirkungs-Untersuchungen

Die Beurteilung der Basalschäden der drei untersuchten Gruppen zeigte, daß für die Gruppe der akut reagierenden Patienten die größte Variationsbreite bestand (6,5-13,8% *DNS im Schweif*). Dabei ist zu beachten, daß die Blutabnahme maximal vier Wochen nach Ende der Strahlentherapie durchgeführt wurde. Bei einer Lebensdauer von ca. 730 Tagen für Lymphozyten und ca. 7 - 24 Stunden für Granulozyten muß hier der Einfluß der langlebenden Lymphozytenpopulation beachtet werden. Eine Patientin wurde mit einer simultanen Radiochemotherapie behandelt. Aus den hier gezeigten Dosis-Wirkungs-Kurven und angeführten Basalschäden ist es nicht möglich, die verschiedenen Kollektive zu unterscheiden. Bei Nachuntersuchung verschiedener Patientenkollektive konnten Alapetite und Leprat keine persistierenden DNS-Schäden detektieren. In diesen wie auch den hier vorgestellten Experimenten wurde kein Unterschied in den Dosis-Wirkungs-Beziehungen unterschiedlicher Überreagierer-Kollektive gefunden [1, 2].

Bei den beiden Patientinnen mit stark ausgeprägten Spätreaktionen befanden sich diese Kurven im unteren Bereich der dargestellten Kurvenschar. In einer Arbeit von Nakamura et al. [39] wurde der  $D_{10}$ -Wert von  $G_0$ -Lymphozyten (gibt die Dosis an, bei der noch 10% der bestrahlten Zellen überleben) für 31 Personen mit  $3,59 \pm 0,18$  Gy und für 28 Bestimmungen an einem Individuum mit  $3,66 \pm 0,21$  Gy im Koloniebildungstest bestimmt [8]. Aus diesen Daten läßt sich schließen, daß sich inter- und intraindividuelle Strahlenempfindlichkeit bezüglich der Dosis-Wirkung

ähnlich verhalten. Ein Unterschied besteht darin, daß sich die hier gezeigten Daten auf den Initialschaden beziehen. Die Daten von Nakamura et al. schließen Reparaturprozesse ein, da diese Experimente ähnlich dem Koloniebildungstest durchgeführt werden. Die Unterschiede in der intraindividuellen Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten beruhen wahrscheinlich auf Unterschieden im Zellzyklus und in der Einbeziehung aller Lymphozyten. Wenn man Lymphozyten in der Dichtegrad-Sedimentation auftrennt, ergeben sich Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit von B- und T-Lymphozyten [68].

## 4.2.2 Reparaturuntersuchungen

Alle untersuchten Leukozyten zeigten eine Zellreaktion auf eine In-vitro-Bestrahlung. Dabei waren die Leukozyten der Kontroll- und Akutreagierer-Gruppen gut zu schneller und langsamer Reparatur befähigt. Es werden hier keine Aussagen zur Korrektheit dieses Vorganges getroffen. Betrachtet man den Residualschaden nach einer Dosis von 0,7 Gy, so ist ein relativ ungeordnetes Verhalten in allen Gruppen offensichtlich. Für die In-vitro-Ergebnisse kann man dazu annehmen, daß diese Dosis nicht ausreichend ist, um notwendige Reparaturvorgänge zu induzieren. Bei Dosiseskulation laufen die Reparaturvorgänge dann geordnet ab. Man kann deutlich zwei Reparaturkinetikformen unterscheiden. Innerhalb der ersten 10 Minuten nach Bestrahlung wurden ca. 50% des DNS-Schadens in den hier untersuchten Leukozyten korrigiert.

Olive et al. zeigten in verschiedenen Experimenten, daß ca. 50% der Lymphozyten nur den langsamen Wiederverknüpfungsweg (Phase II der Reparatur) nutzen [47,48]. Ein Großteil der Einzelstrangbrüche wird nach anderen Untersuchungen dabei einfach wiederverknüpft ("Rejoining") [6]. Alle Zellen einer Population reagieren in ähnlicher Weise auf Bestrahlung. In einer Untersuchung an zehn gesunden Spendern konnten Banath et al. zeigen, daß durch die schnelle Reparaturkomponente  $47 \pm 16\%$  an Einzelstrangbrüchen korrigiert werden [6]. Für die langsame Reparatur wurde dabei eine Halbwertszeit von  $1,3 \pm 0,4$  h errechnet. In peripheren Lymphozyten laufen die Reparaturvorgänge nicht in vollem Maße ab, da nur wenige Deoxyribonukleotide und eine geringere Enzymaktivität vorhanden sind. Bei der Strahlenempfindlichkeitsmessung von Lymphozyten ist vor allem zu beachten, daß diese auf schädigende Einflüsse schnell mit Apoptose und Nekrose reagieren. Die Einzelstrangbruch-Reparatur verläuft sehr heterogen. Nach Bestrahlung mit 8 Gy konnten zwei Subpo-

pulationen im Reparaturprozeß ausgemacht werden. Ca. 50% der Zellen reparieren doppelt so schnell wie die übrigen Zellen [6]. Diese Aussage konnten Banath et al. für alle untersuchten Individuen treffen. Im Gegensatz dazu läuft die Korrektur von Doppelstrangbrüchen homogen ab. Es konnte keine Abhängigkeit zwischen Residualschaden und Reparaturgeschwindigkeit bewiesen werden. Aus der nachgewiesenen Korrelation zwischen der Halbwertszeit ( $\tau$ ) der langsamen Reparaturkomponente von Einzelstrangbrüchen und der nicht-reparierten Doppelstrangbruch-Fraktion nach 2-4 Stunden, kann man schließen, daß in den langsam reparierenden Lymphozyten ebenso Doppelstrangbrüche vorkommen. Es wäre aber auch die Existenz einer Zellpopulation denkbar, welche nicht reparieren kann oder aber unmittelbar nach Bestrahlung einem schnellen DNS-Degradationsprozeß unterliegt [6].

Außerdem haben auf den so gemessenen Schadensparameter (*% DNS im Schweif*) andere Faktoren Einfluß. Unter alkalischen Lysebedingungen entstehen zusätzliche alkalilabile Stellen, diese führen zu einer Erhöhung der DNS-Schädigung. Zum Verhaken ("Entangling") von freien DNS-Enden kommt es, wenn die Gele in der Neutralisationslösung Renaturierungsprozessen unterliegen. Damit wird eine verbesserte Reparatur vorgetäuscht [46]. Andere Einflüsse auf das Reparaturverhalten sind z.B. die Art der Vorbehandlung und der Zeitraum seit der Vorbehandlung der Patienten. In einer Arbeit von Leprat et al. [31] wurde gezeigt, daß Patienten, die im Kindesalter wegen eines Kopf-Hals-Tumors bestrahlt wurden, auf eine In-vitro-Bestrahlung der Lymphozyten anders als das Kontrollkollektiv reagierten. In den Initialschäden unmittelbar nach Bestrahlung wurden keine Differenzen deutlich. Betrachtet man aber die Reparaturkinetik, so fällt auf, daß die vorbestrahlten Patienten deutlich langsamer reparieren. Außerdem ist in dieser Gruppe der Residualschaden nach 60 Minuten signifikant erhöht. Dennoch war für alle untersuchten Lymphozyten eine Tendenz zur Reparatur nachweisbar. Diese und unsere eigenen Ergebnisse lassen die Vermutung zu, daß die interindividuelle Variationsbreite der Strahlenreaktion ebenso wie die Standardabweichung im Patientenkollektiv deutlich größer sind als in der Kontrollgruppe.

## 4.3 Untersuchungen während Ganzkörperbestrahlungen

### 4.3.1 Blutbildveränderungen

Während der Ganzkörper-(TBI) bzw. Ganzknochenmarkbestrahlung (TMI) wurde bei zwei von drei Patienten das Verhalten der Leukozyten im peripheren Blut untersucht. Es konnte dabei zwischen Lymphozyten allgemein und neutrophilen Granulozyten unterschieden werden. Das Verhältnis dieser Zellpopulationen zueinander war für die Interpretation der hier gezeigten Daten interessant, da für die *Comet-Assay*-Experimente keine Separation der Populationen durchgeführt wurde. Wenn man das In-vivo-Reparaturverhalten von Leukozyten (Lymphozyten und Granulozyten) unmittelbar nach einer Ganzkörperbestrahlung messen will, verbleibt keine Zeit zur Separation, da in dieser Zeit ebenfalls Reparaturvorgänge ablaufen würden. Um aber in etwa abschätzen zu können, welche Zellpopulation man bezüglich ihres DNS-Schadens charakterisiert hat, ist es notwendig, das Blutbild parallel zu bestimmen. Die Hämoglobinwerte der zwei Patienten nahmen erwartungsgemäß nur geringfügig ab. Die Lymphozyten- und neutrophile Granulozytenanzahl hingegen verhielten sich zueinander invers. Bis zu einer Gesamtdosis von 4 Gy bzw. 3 Gy war bei beiden Patienten ein Granulozytenanstieg meßbar. Im Folgenden traten keine weiteren Veränderungen bis zu einer Gesamtdosis von 10 Gy vs. 7,5 Gy auf. Dann sank die Granulozytenzahl wieder auf den Ausgangswert ab. Die Lymphozytenzahl zeigte ein gegensätzliches Verhalten. Bis zum Erreichen einer Gesamtkörperdosis von 4 Gy bzw. 3 Gy kam es zum starken Lymphozytenabfall. Danach bestand bei einem Patienten ab 6 Gy eine konstante Lymphozytenzahl. Bei der anderen Patientin war ein ähnliches Verhalten bis 4,5 Gy zu verzeichnen. Bei einer Gesamtkörperdosis von 7,5 Gy war die Lymphozytenzahl in diesem Fall nach Ganzknochenmarkbestrahlung nicht mehr meßbar. Ähnliche Ergebnisse wurden nach Einzeitganzkörperbestrahlungen von Hunden gefunden [29].

Das Verhalten von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten spiegelt eine "normale" Immunreaktion unter Streßbedingungen wider. Im peripheren Blut zirkuliert der kleinste Anteil von Granulozyten. Alle weiteren Granulozyten befinden sich im Gewebe zur Infektabwehr bzw. im Knochenmark. Die Granulopoese dauert ca. vier Tage. Im peripheren Blut haben neutrophile Granulozyten eine relativ kurze

Halbwertszeit von neun Stunden. Danach erfolgt der Übertritt in das Gewebe (z.B. Schleimhäute) zur Infektabwehr mittels Phagozytose.

In den untersuchten Gelpräparationen der Blutzellen konnten Apoptosefiguren nachgewiesen werden. Allerdings ist es mit dem hier angewandten Assay nicht möglich, eine Quantifizierung oder eine Differenzierung in Lymphozyten und Granulozyten vorzunehmen. In der Literatur sind beträchtliche Anteile apoptotischer Lymphozyten (ca. 50%) nach einer Gesamtkörperdosis von 2 Gy beschrieben. Dabei fiel eine signifikante Varianz zwischen den einzelnen Patienten bezüglich der Apoptosefrequenz auf [71]. Dies ist als möglicher Hinweis auf Unterschiede in der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit zu werten.

An acht Patienten unter fraktionierter Beckenbestrahlung untersuchten Louagie et al. [33] das Verhalten einzelner Leukozytenpopulationen. Die Ergebnisse verdeutlichen, daß jede Subpopulation über eine spezifische Strahlenempfindlichkeit verfügt. B-Lymphozyten (CD 19 positiv) (Abfall der absoluten Anzahl auf 10% des Ausgangswertes nach 1,5 Gy Äquivalentganzkörperdosis) fielen dabei mit einer deutlichen höheren Empfindlichkeit als T-Lymphozyten (Abfall der absoluten Anzahl auf 20% des Ausgangswertes nach 2,5 Gy Äquivalentganzkörperdosis) auf. Die Subklassifizierung von T-Lymphozyten erbrachte kaum Unterschiede bezüglich der Strahlenempfindlichkeit. Die ebenfalls charakterisierten NK-Zellen ("natural killer cells") zeigten eine relative Radioresistenz. Für B- und T-Lymphozyten war eine starke Abnahme der absoluten Zellzahl innerhalb der ersten Bestrahlungswoche zu verzeichnen, danach zeigte sich die Zellzahl nahezu konstant. Eine Verminderung der NK-Zellen war hingegen über mehrere Wochen langsam zu bemerken. Zum Ende der Strahlentherapie entsprach die Anzahl der NK-Zellen zahlenmäßig den T-Lymphozyten. Diese Untersuchungen unterstreichen die aus Apoptose-In-vitro-Versuchen gewonnen Erkenntnisse [33]. Ähnliche Ergebnisse wurden nach Ganzkörperbestrahlung mit Protonen bei Mäusen gefunden. Kajioka et al. fanden zusätzlich Unterschiede in der Radiosensitivität von T-Helfer- (CD 4) und T-Suppressorzellen (CD 8). CD 4 positive Zellen erscheinen empfindlicher [28]. Anhand der aufgelisteten Daten ist zu sehen, daß auch eine Separation in Lymphozyten und Granulozyten nicht ausreichend wäre, um die Strahlenempfindlichkeit einer der Subpopulationen zu bestimmen.

Die hier gezeigten Blutbildveränderungen entsprechen somit den bekannten Befunden der Literatur. Die Lymphopenie durch Strahlung wird durch das Zusam-

menwirken vieler Faktoren ausgelöst. Zum einen besteht eine direkte zytotoxische Wirkung der Strahlung durch DNS- und Zellorganell-Schädigung. Zum anderen wird über die Expression strahleninduzierter Zytotoxine, wie z.B.  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{TGF}\beta$  sowie CD95-Ligand eine Lymphopenie begünstigt [28]. Außerdem unterliegen Lymphozyten relativ schnell apoptotischen Prozessen. Nach Einwirkung von Strahlung wird das CD95-Oberflächenantigen exprimiert und über Ligandbindung Apoptose ausgelöst. Die von uns gemessenen Blutbildveränderungen scheinen somit physiologischen Prozessen zu folgen.

### 4.3.2 DNS-Basalschädigung vor jeder Bestrahlung

Der Vergleich der Basalschädigung aller drei untersuchten Patienten ergab, daß die Leukozyten bei allen Probanden ähnlich reagierten. Die Ausgangswerte der DNS-Basalschädigung vor der ersten Bestrahlungsfraction lagen für alle Patienten dicht beieinander. Vorherige Chemotherapien und bei einer Patientin die vorausgegangene Bestrahlung sowie die individuelle Strahlenempfindlichkeit nahmen Einfluß auf diesen Wert. Die bereits bestrahlte Patientin zeigte keinen höheren Basalschaden als die anderen Patienten. Diese Beobachtung entspricht Befunden aus der Literatur [2, 31]. In jedem folgenden, gemessenen Ausgangswert sind die Auswirkungen der vorherigen Ganzkörper- bzw. Ganzknochenmarkbestrahlung und die Reparatur-effekte einzubeziehen. Für jeden Patienten bestand zwischen dem Ausgangswert bei 0 Gy und dem Meßwert vor der letzten Fraction (nach 10 Gy bzw. 7,5 Gy) eine deutliche Differenz. Eine Vergrößerung des Ausgangsschadens (von 12% auf 25% DNS im Schweif) konnte gemessen werden. Bei einem Patienten war eine Plateauphase ab 4 Gy Gesamtkörperdosis zu verzeichnen. In diesem Fall scheint sich das Gleichgewicht zwischen DNS-Schädigung und Reparatur früher eingestellt zu haben. Bei den anderen Patienten nahm das gemessene Schadensausmaß vor jeder Bestrahlungsfraction zu. Diese Ergebnisse zeigen, daß periphere Blutzellen unter den Bedingungen einer fraktionierten Ganzkörperbestrahlung nicht nur letale Strahlenschäden, sondern wie auch zu erwarten, subletale Schäden erleiden. Da die gemessenen DNS-Schäden nicht monoton zunehmen, kann man für Lymphozyten und Granulozyten auch unter diesen extremen Bedingungen Reparaturvorgänge annehmen. Aber es kommt dennoch zu einer Kumulation des DNS-Basalschadens. Offensichtlich werden die notwendigen Reparaturenzyme vermehrt aktiviert bzw. zusätzlich exprimiert [22], bis ein Gleichgewicht zwischen neu induziertem Schaden und reparierter DNS hergestellt ist. Um

dieses Gleichgewicht einzustellen, scheint die Applikation einer gewissen Schwellendosis nötig zu sein. Es konnte in Säugerzellen gezeigt werden, daß die Regulation von Reparaturproteinen vorrangig über die Regulation der Stabilität und Enzymaktivität dieser Proteine funktioniert [22].

### 4.3.3 In-vitro-Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Vor jeder Bestrahlungsfraction wurden die Leukozyten der drei Patienten unter In-vitro-Bedingungen bestrahlt. Alle Patienten zeigten eine dosisabhängige Wirkung. Bei der graphischen Darstellung der Meßwerte erhielt man eine Kurvenschar, wobei die einzelnen Dosis-Wirkungs-Kurven parallel zueinander verschoben erschienen. Die vorher applizierte In-vivo-Ganzkörperdosis löste offensichtlich einen DNS-Schaden aus, welcher nicht vollständig korrigiert wurde. Die Ursachen sind vielfältiger Art. Durch direkte Strahleneinwirkung sind Schäden in Fehlererkennungssequenzen und dazugehörigen Proteinen möglich. Außerdem ist zu bedenken, daß die biologische Aktivität von Reparaturenzymen nicht unendlich gesteigert werden kann. DNS-Fehler werden nicht in allen Bereichen des Genoms gleichwertig repariert. Vielmehr sind Zellen wahrscheinlich in der Lage, zwischen den für sie "wichtigen" Arbeitssequenzen und eher "unwichtigen" Struktursequenzen zu unterscheiden. Mit dem *Comet-Assay* kann man keine Aussagen zur funktionellen Integrität der Zellen treffen. Aber anhand der Aussagen zur Einzeitganzkörperbestrahlung im Tierversuch läßt sich schlußfolgern, daß auch unter fraktionierter Ganzkörperbestrahlung nur diejenigen Gensequenzen einer Zelle repariert werden, welche zum Funktionserhalt notwendig sind. Nach Ganzkörper-Protonen-Bestrahlung von Mäusen konnte gezeigt werden, daß vor Erholung der Zellzahl (B- und T-Lymphozyten) bereits eine funktionelle Restitution gegeben war [28]. Bei einer relativ kurzen Lebenszeit der Leukozyten im peripheren Blut erscheint es sinnvoller, wenn im Knochenmark befindliche Zellen Reparaturprozesse durchlaufen, um dann in der Peripherie ihre Funktion erfüllen zu können.

### 4.3.4 Reparaturuntersuchungen

Die Reparaturuntersuchungen wurden in-vitro und in-vivo durchgeführt. In-vitro-Leukozyten wurden im Brutschrank über den selben Zeitraum inkubiert, wie im Organismus In-vivo-Reparatur ablief. Das In-vivo-Reparaturverhalten jedes einzelnen

Patienten entsprach nahezu seinem In-vitro-Reparaturverhalten. An den Leukozyten der zwei NHL-Patienten konnten in beiden Versuchsarmen Effekte der langsamen und schnellen Reparatur gefunden werden. Bei der dritten Patientin verhielten sich die individuellen In-vivo- und In-vitro-Kurven sehr ähnlich. Im Vergleich zu den anderen beiden Patienten war ab einer Gesamtkörperdosis von 6 Gy ein verändertes Reparaturverhalten sichtbar. Innerhalb der ersten 15 Minuten kam es zu keiner Begrenzung des DNS-Schadens. Die schnelle Reparaturkomponente existiert offensichtlich nicht. Nach Ende der 30-minütigen Reparaturzeit nahm der gemessene DNS-Anteil im Schweif zu. Diese Effekte gelten für In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen. Bei dieser Patientin (RP) befand sich bei der Gesamtkörperdosis von 6 Gy keine meßbare Lymphozytenzahl mehr im Blut. Die Anzahl der Granulozyten dagegen erreichte den Maximalwert bei 6 Gy. Aus der Tatsache des Vorliegens einer Mischpopulation von Leukozyten (Granulozyten und Lymphozyten) erschien es wenig sinnvoll, die Reparaturhalbwertszeit zu berechnen. Im Verlauf der Ganzkörper- bzw. Ganzknochenmarkbestrahlung über drei Tage veränderte sich die Zusammensetzung der Leukozytenpopulation, wobei es zu einer Verschiebung zugunsten der Granulozyten kam. Aus diesem Grund werden die hier gezeigten Kurven nur qualitativ beschrieben.

In *Comet-Assay*-Experimenten von Lymphozyten und Granulozyten konnte von Lankinen et al. gezeigt werden, daß sich die beiden Zellarten in ihrer Kometenstruktur unterscheiden. Granulozyten scheinen zu einem längeren Kometen zu führen als Lymphozyten [30]. Bereits nach 15 Minuten Reparatur konnte für beide Zellarten eine signifikante Verminderung der Schweifausprägung gemessen werden. Das verdeutlicht den Trend, daß Lymphozyten schneller als Granulozyten und in einem größerem Ausmaß den Schaden reparieren. Von Vilpo et al. wurde in Untersuchungen zur Enzymaktivität von Progenitor- und reifen Granulozyten gezeigt, daß reife Granulozyten nur über sehr geringe Enzymaktivität von DNS-Glykosylase - notwendig zur NER - verfügen [69]. Diese Aktivität entspricht ca. 2-3% der Glykosylase-Aktivität von Lymphozyten. Dennoch sind reife Granulozyten in der Lage, DNS-Schäden mit dem Mechanismus der NER zu korrigieren. In neueren Experimenten von Lankinen et al. wurde die Möglichkeit zur Regulation der mRNS-Expression in Granulozyten untersucht und nachgewiesen, daß eine Mehrexpression der Glykosylase-mRNS möglich ist. Damit kann der Reparaturreffekt auch in reifen Granulozyten erklärt werden [68].

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Zellmodelle bezüglich ihres Verhaltens nach Strahleneinwirkung mit dem *alkalischen Comet-Assay* untersucht. Diese Form der DNS-Schadensquantifizierung eröffnet die Möglichkeit, schnell und kosteneffizient Aussagen bezüglich der Strahlenempfindlichkeit von Einzelzellen zu treffen. Die Vorteile des *Comet-Assay* sind offensichtlich. Man benötigt wenige Tausend Zellen. Heterogenitäten in der DNS-Schadenausprägung werden gut detektiert. Deutlich kann zwischen hypoxischen, apoptotischen, strahlen- und chemotherapiere-sistenten Zellen unterschieden werden. Dazu kann das Protokoll jeweils modifiziert werden. Über die Gesamtfluoreszenzintensität des einzelnen Kometen kann man den DNS-Gehalt einer Zelle, also Aussagen zur Ploidie, bestimmen [46]. Nachteile des *alkalischen Comet-Assay* bestehen unter anderem darin, daß bei Bestrahlung mit weniger als 1 Gy nicht immer eine Differenzierung der DNS-Schädigung möglich ist. Die Ursachen dafür sind verschiedenartig, so werden durch Dosen kleiner als 1 Gy sehr kleine Bruchstücke erzeugt, welche durch den Lyse- und Elektrophorese-prozeß aus dem Gel verschwinden. Weiterhin besitzt das Bildverarbeitungssystem eine Unterscheidungsschwelle oberhalb der zu messenden Schäden. Außerdem lassen Veränderungen in der DNS-Struktur und der Konformation eine effiziente Bindung des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid nicht zu.

Anhand der Experimente mit drei Sarkomzellkulturen (US 8-93, LMS 6-93 und SAOS-2) konnte bestätigt werden, daß es mit dem *Comet-Assay* prinzipiell möglich ist, verschiedene Effekte der DNS-Schädigung nachzuweisen. Nach Bestrahlung wurden für die einzelnen Kulturen auf Einzelzellniveau dosis- und zeitabhängige DNS-Schäden gemessen. Die Phänomene der DNS-Reparatur wurden von zwei Seiten betrachtet. Einerseits führten wir Experimente zum nativen Reparaturablauf und

andererseits zur Modulation von Reparaturvorgängen durch. Durch den Einsatz von Koffein, konnte dessen direkte Zytotoxizität und die indirekten Effekte über die Reparaturhemmung in den zwei Sarkomzellkulturen LMS 6-93 und US 8-93 bestätigt werden. Außerdem war es mit Hilfe der drei Tumorzellkulturen möglich, Heterogenitäten der Einzelzellen zu zeigen. Morphologisch "gute" Kometen waren eindeutig von abnormen Formen zu differenzieren. Damit wurden apoptotische und nekrotische Zellen von der Auswertung ausgenommen.

Vom strahlentherapeutischen Patientengut ist bekannt, daß ca. 5% der Patienten mit verstärkten akuten oder späten Nebenwirkungen auffällig werden. In dieser Arbeit wurden Leukozyten solcher Patienten mit dem *Comet-Assay* untersucht. Zusammenfassend kann man sagen, daß eine Unterscheidung in stark akut- und spät reagierende Patienten allein anhand der Dosis-Wirkungs-Beziehungen nicht möglich war. Die Beurteilung der Initialschäden nach Bestrahlung ist nicht ausreichend, um eine Gruppenzuordnung vorzunehmen. Das Testsystem muß vielmehr in Richtung Reparaturuntersuchungen genutzt werden. Für alle untersuchten Probanden (Patienten und Kontrollpersonen) konnten die in der Literatur beschriebenen schnellen und langsamen Reparaturkomponenten gefunden werden. Die zwei Patienten mit Spätnebenwirkungen zeigten in ihren Leukozyten eine Zunahme der DNS-Schädigung nach 10 Minuten In-vitro-Reparatur. Eine Zunahme des DNS-Schweifanteils kann ein Hinweis für eine beginnende Degradation der DNS im Ablauf der Apoptose darstellen. Das beschriebene Phänomen wurde nur in dieser Patientengruppe gefunden. Weiterhin ergibt sich aus den Untersuchungen, daß eine Bestrahlungsdosis von 0,7 Gy keine geordneten Reparaturvorgänge auslösen kann. Dieses Aussage gilt nicht nur für die untersuchten Leukozyten, sondern auch für die charakterisierten Sarkomzelllinien. Zur weiteren Charakterisierung "überreagierender" Patienten scheint es daher sinnvoll, in einem aus mehreren Testsystemen bestehendem Versuch prospektiv und retrospektiv Daten zu gewinnen, welche eine Eingrenzung des Phänomens der "Strahlenüberempfindlichkeit" erlauben.

Strahlenbiologische Untersuchungen zum Vergleich zwischen In-vivo- und In-vitro-Bestrahlung sind vor allem am Tiermodell (Maus und Hund) durchgeführt worden. Ziel dieser Experimente war es, Unterschiede in Stoffwechselfunktionen zu demonstrieren (Hepatozytenfunktion). Publierte Daten zu Untersuchungen am Menschen beziehen sich vor allem auf Strahlenunfälle und somit auf die Wirkung nach Einzeitganzkörperbestrahlung. Wir hingegen untersuchten das Reparaturverhalten

und das DNS-Schadensausmaß an drei Patienten unter fraktionierter Ganzkörper- (TBI) bzw. Ganzknochenmarkbestrahlung (TMI) in Vorbereitung auf eine Knochenmarktransplantation. Als das wichtigste Ergebnis dieser Experimente sehen wir die Tatsache, daß selbst unter diesen extremen Bedingungen die Reparaturmechanismen im Organismus funktionieren. Es konnte bewiesen werden, daß es nicht zur Erschöpfung von Reparaturprozessen kommt. Mit In-vitro-Experimenten wurde bestätigt, daß Zellen in-vivo und in-vitro nach den gleichen Mustern reparieren. Es konnte für alle Patienten ein biphasischer Reparaturkurvenverlauf gefunden werden. Die Ergebnisse der Blutbildveränderungen unter fraktionierter Ganzkörperbestrahlung verdeutlichten, daß unter diesen speziellen Streßbedingungen ein Ansteigen der peripheren neutrophilen Granulozytenpopulation und eine drastische Verminderung der Lymphozytenzahl zu verzeichnen ist. Dieses Phänomen entspricht dem physiologischen Verhalten von Immunzellen.

Anhand der hier aufgeführten Ergebnisse läßt sich schließen, daß das *Comet-Assay* eine sinnvolle Methode zur Bestimmung der individuellen Strahlenempfindlichkeit von Einzelzellen innerhalb eines komplexen Testsystems darstellt. Als alleiniges Mittel zur Abschätzung der Strahlenempfindlichkeit eines Patienten im Rahmen der Bestrahlungsplanung erscheint das *Comet-Assay* zu ungenau. Außerdem genügt es nicht, nur die Strahlenempfindlichkeit des Normalgewebes zu bestimmen. Zur Festlegung der zu applizierenden Dosis ("tailored therapy") [9] muß ebenso die Strahlenempfindlichkeit des zu bestrahlenden Tumorgewebes ermittelt werden. Aus diesen Gründen erscheint es sinnvoll, das *Comet-Assay* als eine Komponente in einem Testsystem zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit anzuwenden.

# Literaturverzeichnis

- [1] Alapetite C, Wachter T, Sage E, Moustacchi E: Use of alkaline comet assay to detect DNA repair deficiencies in human fibroblast exposed to UVC, UVB, UVA and  $\gamma$ -rays. *Int J Radiat Biol* 69 (1996) 359-369
- [2] Alapetite C, Thirion P, de la Rochefordiere A, Cosset JM, Moustacchi E: Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. *Int J Cancer* 83 (1999) 83-90
- [3] Bache M, Dunst J, Würfl P, Fröde D, Meye A, Schmidt H, Rath FW, Taubert H: G2/M Checkpoint is p53-dependent and independent after irradiation in five human sarcoma cell lines. *Anticancer Res* 19 (1999) 1-6
- [4] Bache M: Molekularbiologische Untersuchungen an Weichteilsarkom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus nach Bestrahlung. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, MLU Halle-Wittenberg (2000)
- [5] Bache M, Pigorsch S, Dunst J, Würfl P, Meye A, Bartel F, Schmidt H, Rath FW, Taubert H: Loss of G2/M arrest correlates with radiosensitization in two human sarcoma cell lines with mutant p53. *Int J Cancer* 96 (2001) 110-117
- [6] Bánath JP, Fushiki M, Olive PL: Rejoining of DNA single- and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 73 (1998) 649-660
- [7] Bauch T: Messung von DNA-Schäden und -Reparatur in Einzelzellen. Dissertation, Fachbereich Bio- und Geowissenschaften, Universität Gesamthochschule Essen (1996)
- [8] Bentzen SM, Overgard J: Patient-to-patient variability in the expression of radiation-induced normal tissue injury. *Semin Radiat Oncol* 4 (1994) 68-80

- [9] Bentzen SM: Potential clinical impact of normal-tissue intrinsic radiosensitivity testing. *Radiother Oncol* 43 (1997) 121-131
- [10] Biade S, Stobbe CC, Chapman JD: The intrinsic radiosensitivity of some human tumor cells throughout their cell cycles. *Radiat Res* 147 (1997) 416-421
- [11] Bristow RG, Benchimol S, Hill RP: The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. *Radiother Oncol* 40 (1996) 197-223
- [12] Bristow RG, Hu Q, Jang A, Chung S, Peacock J, Benchimol S, Hill R: Radio-resistant MT p53-expressing rat embryo cell transformants exhibit increased DNA-dsb rejoining during exposure to ionizing radiation. *Oncogene* 16 (1998) 1789-1802
- [13] Budach W: Genetische Prädisposition und Strahlenempfindlichkeit von Tumoren. *Strahlenther Onkol* 173 (1997) 469-479
- [14] Burnet NG, Nyman J, Turesson I: Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet* 339 (1992) 1570-1571
- [15] Burnet NG, Wurm R, Nyman J, Peacock JH: Normal tissue radiosensitivity - How important is it? *Clin Oncol* 8 (1996) 25-34
- [16] Chapman JD, Stobbe CC, Gales T, Das IJ, Zellmer DL, Biade S, Matsumoto Y: Condensed chromatin and cell inactivation by single-hit kinetics. *Radiat Res* 151 (1999) 433-441
- [17] Collins AR, Ai-guo M, Duthie SJ: The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 336 (1995) 69-77
- [18] Cosset JM, Socie´ G, Girinsky T, Dubray B, Fourquet A, Gluckman E: Radiobiological and clinical bases for total body irradiation in the leukemias and lymphomas. *Semin Radiat Oncol* 5 (4) (1995) 301-315
- [19] Crompton NEA, Ozsahin M, Schweizer B, Larsson B, Luetolf UM: Theory and practice of predictive assays in radiation therapy. *Strahlenther Onkol* 173 (1997) 58-67

- [20] Dunst J, Gebhart E, Neubauer S: Kann man extrem erhöhte Strahlensensitivität von Patienten durch in-vitro-Testung von Lymphozyten erkennen? *Strahlenther Onkol* 171 (1995) 581-586
- [21] Dunst J, Neubauer S, Becker A, Gebhart E: Chromosomal in-vitro radiosensitivity of lymphocytes in radiotherapy patients and AT-homozygotes. *Strahlenther Onkol* 174 (1998) 510-516
- [22] Eckardt-Schupp F, Klaus C: Radiation inducible DNA repair process in eukaryotes. *Biochim* 81 (1999) 161-171
- [23] Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL: The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339 (1995) 37-59
- [24] Geara FB, Peters LJ, Ang KK: Prospective comparison of in-vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 27 (1993) 1173-1179
- [25] Gerlach R, Pigorsch S, Bache M, Dunst J: Untersuchungen zur Strahlenempfindlichkeit zweier Sarkomzelllinien mit Hilfe des Comet Assays und des Zellkoloniebildungstests. *Strahlenther Onkol* 175, Suppl. 1, (1999) 65
- [26] Higuchi K, Mitsushashi N, Saitoh J, Maebayashi K, Sakurai H, Akimoto T, Niibe H: Caffeine enhanced radiosensitivity of rat tumor cells with a mutant-type p53 by inducing apoptosis in a p53-independent manner. *Cancer Letters* 52 (2000) 157-162
- [27] Johansen J, Bentzen SM, Overgard J: Relationship between the in-vitro radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, teleangiectasia and skin erythema after radiotherapy. *Radiother Oncol* 40 (1996) 101-109
- [28] Kajioka EH, Andres ML, Li J, Mao XW, Moyers MF, Nelson GA, Slater JM, Gridley DS: Acute effects of whole-body irradiation on the immune system of the mouse. *Radiat Res* 153 (2000) 587-594
- [29] Kreja L, Selig C, Nothdurft W: Assessment of DNA damage in canine peripheral blood and bone marrow after total body irradiation using single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res* 359 (1996) 63-70

- [30] Lankinen MH, Vilpo LM, Vilpo JA: UV- and  $\gamma$ -irradiation induced DNA single-strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes. *Mutat Res* 352 (1996) 31-38
- [31] Leprat F, Alapetite C, Roselli F, Ridet A, Schlumberger M, Sarasin A, Suarez HG, Moustacchi E: Impaired DNA repair as assessed by the "Comet" Assay in patients with thyroid tumours after a history of radiation therapy: a preliminary study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 40 (1998) 1019-1026
- [32] Link CJ: Caffeine inhibits gene specific repair of UV-induced DNA damage in hamster cells and in human xeroderma pigmentosum group C cells. *Carcinogenesis* 16 (1995) 1149-1155
- [33] Louagie H, van Eijkeren M, Phillippe J, Thierens H, de Ridder L: Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in patients undergoing radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75 (1999) 767-771
- [34] Masuda H, Miller C, Koeffler HP, Battifora H, Cline MJ: Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (1987) 7716-7719
- [35] McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, Deo Meo MP, Collins A: The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat Res* 288 (1993) 47-63
- [36] Meye A, Bache M, Hinze R, Schmidt H, Würfl P, Holzhausen HJ, Rath FW, Taubert H: Molecular characterization and liposomal transfection of a p53-mutated cell line established from a poorly differentiated leiomyosarcoma. *Int J Oncol* 13 (1998) 241-248
- [37] Müller W-U, Bauch T, Streffer C, Niedereichholz F, Böcker W: Comet Assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumour cell lines. *Int J Radiat Biol* 65 (1994) 315-319
- [38] Myllyperkio MH, Koshki TR, Vilpo LM, Vilpo JA: Gamma-irradiation-induced DNA single- and double-strand breaks and their repair in chronic lymphocytic leukemia cells of variable radiosensitivity. *Hematol Cell Ther* 41 (3) (1999) 95-103

- [39] Nakamura N, Sposto R, Kushiro JI: Is interindividual variation of cellular radiosensitivity real or artifactual? *Radiat Res* 125 (1991) 326-330
- [40] Nias AHW: An introduction to radiobiology. Wiley, Chichester, New York, Weinheim (usw.), 1998
- [41] O'Connor PM, Jackmann J, Bae I: Characterization of the p53 tumorsuppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 57 (1997) 4285-4300
- [42] Olive PL, Durand RE: Detection of hypoxic cells in a murine tumor with the use of the comet assay. *J Natl Cancer Institute* 84 (1992) 707-711
- [43] Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Bánath JP: Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp Cell Res* 198 (1992) 259-267
- [44] Olive PL, Durand RE, LeRiche J, Olivotto IA, Jackson SM: Gel electrophoresis of individual cells to quantify hypoxic fraction in human breast cancers. *Cancer Res* 53 (1993) 733-736
- [45] Olive PL, Banath JP: Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat Res* 294 (1993) 275-283
- [46] Olive PL, Banath JP, Fjell CD: DNA strand breakage and DNA structure influence staining with propidium iodide using the alkaline comet assay. *Cytometry* 16 (1994) 305-312
- [47] Olive PL: The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat Res* 150 (1998) S42-S51
- [48] Olive PL, Johnston PJ, Banath JP, Durand RE: The comet assay: A new method to examine heterogeneity associated with solid tumors. *Nature med* 4 (1998) 103-105
- [49] Olive PL, Durand RE, Jackson SM, LeRiche JC, Luo C, Ma R, McLaren C, Aquino-Parsons C, Thomson TA, Trotter T: The comet assay in clinical practice. *Acta Oncol* 38 (1999) 839-844

- [50] Östling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123 (1984) 291-298
- [51] Östling O, Johanson KJ, Blomquist E, Hagelquist E: DNA damage in clinical radiation therapy studied by microelectrophoresis in single tumour cells. *Acta Oncol* 26 (1986) 45-48
- [52] Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, Owen R, Regan J, Yarnold J: Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiother Oncol* 55 (2000) 173-178
- [53] Pfeiffer P, Göttlich B, Reichenberger S, Feldmann E, Daza P, Ward JF, Milligan JR, Mullenders LHF, Natarjan AT: DNA lesions and repair. *Mutat Res* 336 (1996) 69-80
- [54] Pigorsch SU, Bache M, Dunst J: Investigation of two soft tissue sarcoma cell lines by means of the Comet Assay. *Strahlenther Onkol* 175(1) (1999) 65
- [55] Pigorsch SU, Gerlach R, Dunst J: Differences in lymphocyte repair in patients with severe acute and late side effects undergoing radiotherapy. In: Bodis S, Dikomey E, Rodemann P (Hrsg): *Molecular Radiation Biology Oncology*. Paul Zielfleisch, Stuttgart. 2000, S.32
- [56] Powell SN, De Frank JS, Connell P, Eogan M, Preffer F, Dombkowski D, Tang W, Friend S: Differential sensitization of p53(-) and p53(+) cells to caffeine-induced radiosensitization and override of G2 delay. *Cancer Res* 55 (1995) 1643-1648
- [57] Ribeiro JC, Barnetson AR, Jackson P, OW K, Links M, Russell PJ: Caffeine-increased radiosensitivity is not dependent on a loss of G2/M arrest or Apoptosis in bladder cancer cell lines. *Int J Radiat Biol* 75(4) (1999) 481-492
- [58] Rojas E, Lopez MC, Valverde M: Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatography B* 722 (1999) 225-254
- [59] Ruiz de Almodovar JM, Nunez MI, McMillan TJ, Olea N, Mort C, Villalobos M, Pedraza V, Steel GG: Initial radiation-induced DNA damage in human tumor cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. *Br J Cancer* 69 (1994) 457-462

- [60] Scherer E, Sack H: Strahlentherapie. Georg Thieme Stuttgart, New York, 1989
- [61] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175 (1988) 184-191
- [62] Singh NP, Tice RR, Stephens RE, Schneidern EL: A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutat Res* 252 (1991) 289-296
- [63] Singh NP, Stephens RE, Schneider EL: Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int J Radiat Biol* 66 (1994) 23-28
- [64] Taubert H, Schmidt H, Würll P, Hinze R, Meye A, Bache M, Berger D, Holzhausen HJ, Dralle H, Rath FW: Morphological and molecular characterization of an undifferentiated soft tissue sarcoma cell line and derivative clones. *Int J Oncol* 11 (1997) 521-526
- [65] Terzoudi GI, Pantelias GE: Conversion of DNA damage into chromosome damage in response to cell cycle regulation of chromatin condensation after irradiation. *Mutagen* 12 (1997) 271-276
- [66] Tice RR, Strauss GHS: The single cell gel electrophoresis / comet assay: A potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 13 (suppl -1) (1995) 207-241
- [67] Tubiana M: Strahlung in der Medizin. *Spektrum der Wissenschaft, Dossier Radioaktivität* (1997) 32-39
- [68] Vijayalaxmi, Strauss GHS, Tice RR: A analysis of  $\gamma$ -ray-induced DNA damage in human blood leukocytes, lymphocytes and granulocytes. *Mutat Res* 292 (1993) 123-128
- [69] Vilpo JA: The DNA-repair enzyme uracil-DNA glycosylase in the human hematopoietic system. *Mutat Res* 193 (1988) 207-217
- [70] West CM, Davidson SE, Elyan SA: The intrinsic radiosensitivity of normal and tumour cells. *Int J Radiat Biol* 73 (1998) 409-413

- [71] Wheldon TE: The radiobiological basis of total body irradiation. *Br J Radiol* 70 (1997) 1204-1207
- [72] Wojcik A, Streffer C: Application of a multiple fixation regimen to study the adaptive response to ionizing radiation in lymphocytes of two human donors. *Mutat Res* 326 (1995) 109-116
- [73] Wojcik A, Sauer K, Zölzer F, Bauch T, Müller WU: Analysis of DNA damage recovery process in the adaptive response to ionizing radiation in human lymphocytes. *Mutagen* 11 (1996) 291-297

# Thesen

Seit Einführung der Strahlentherapie in die Tumorbehandlung gibt es Bestrebungen, das Risiko für mögliche radiogen induzierte Nebenwirkungen prätherapeutisch abzuschätzen. Innerhalb der letzten 20 Jahre wurden verschiedene Testverfahren entwickelt, um die Strahlenempfindlichkeit von Tumor- und Normalgeweben zu beurteilen. Im Rahmen der Arbeit sollte untersucht werden, ob die Einzelzell-Gelelektrophorese (*Comet-Assay*) in der Lage ist, Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit verschiedener Zellarten zu detektieren. Dabei stand u.a. die Frage im Mittelpunkt, ob man mit Hilfe des *Comet-Assays* quantitative Aussagen über das Reparaturverhalten von Sarkomzellen gewinnen kann. Bei positiver Evaluierung steht eine schnellere und äquivalente Möglichkeit als der bzw. zum Koloniebildungstest zur Verfügung. Weiterhin ist aufgrund der Untersuchungsergebnisse der letzten Jahre bekannt, daß Zellen über unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit verfügen können, welche durch eine Vielzahl von Faktoren bestimmt wird. Insbesondere weisen als Ergebnis einer Überempfindlichkeit ca. 5% der Patienten verstärkte akute oder späte Nebenwirkungen unter der Strahlentherapie auf. Dabei sind für den Strahlentherapeuten Aussagen zur Abschätzung möglicher radiogen bedingter Nebenwirkungen und des Tumoransprechens wichtig, um die dem Patienten angemessene Therapie festzulegen. Im Rahmen der Arbeit wurden Leukozyten dieser Patienten mit dem *Comet-Assay* untersucht. Im Gegensatz zu bisherigen Erkenntnissen aus Strahlenunfällen und Tierexperimenten wurden hier zudem die Auswirkungen unter fraktionierter Ganzkörperbestrahlung auf verschiedene Leukozytenpopulationen untersucht.

1. Mit dem *Comet-Assay* (Einzelzell-Gelelektrophorese) werden Heterogenitäten in der DNS-Schadensausprägung gut detektiert. Es kann zwischen hypoxischen, apoptotischen, strahlen- und chemotherapieresistenten Zellen unterschieden werden. Durch Messung der Gesamtfluoreszenzintensität des einzelnen Kometen kann man den DNS-Gehalt einer Zelle (Ploidie) bestimmen.

2. Durch Dosen kleiner als 1 Gy werden nur sehr kleine DNS-Bruchstücke erzeugt, welche durch den Lyse- und Elektrophoreseprozeß aus dem Gel herausgelöst werden. Aufgrund der Unterscheidungsschwelle des Meßsystems oberhalb von 1 Gy kann man in diesem Fall keine exakte Bestimmung von DNS-Schäden vornehmen.
3. Mit Hilfe der drei Sarkomzellkulturen (US 8-93, LMS 6-93 und SAOS-2) konnte bestätigt werden, daß es mit dem *Comet-Assay* prinzipiell möglich ist, verschiedene DNS-Schädigungen nachzuweisen.
4. Das Methylxanthin Koffein bedingt in p53-defektiven Zellen eine Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit durch Verhinderung der Reparatur. Außerdem besitzt Koffein eine direkte Zytotoxizität. Beide Effekte konnten in den *Comet-Assay*-Untersuchungen der zwei Sarkomzellkulturen LMS 6-93 und US 8-93 bestätigt werden.
5. Desweiteren war es mit Hilfe des *Comet-Assays* an drei Tumorzellkulturen möglich, Heterogenitäten der Einzelzellen zu zeigen. Morphologisch "gute" Kometen waren eindeutig von abnormen Formen zu differenzieren. Damit konnten apoptotische und nekrotische Zellen von der Auswertung ausgenommen werden.
6. Eine Unterscheidung in stark akut- und spät reagierende Patienten ist allein anhand der Dosis-Wirkungs-Beziehungen, die mit dem *Comet-Assay* ermittelt werden, nicht möglich. Die Beurteilung der Initialschäden nach Bestrahlung ist nicht ausreichend, um eine Gruppenzuordnung vorzunehmen. Unterschiede können vielmehr durch Untersuchung des Reparaturverhaltens bestimmt werden.
7. Für alle untersuchten Probanden (Patienten und Kontrollpersonen) konnten die in der Literatur beschriebenen schnellen und langsamen Reparaturphasen gefunden werden.
8. Die zwei Patienten mit Spätnebenwirkungen zeigten in ihren Leukozyten eine Zunahme der DNS-Schädigung nach 10 Minuten In-vitro-Reparatur. Die hierbei registrierte Zunahme des DNS-Schweifanteils kann ein Hinweis für eine beginnende Degradation der DNS im Ablauf der Apoptose darstellen. Das beschriebene Phänomen wurde nur in dieser Patientengruppe festgestellt.

9. Die Analyse der Ergebnisse zeigt, daß eine Bestrahlungsdosis von 0,7 Gy keine geordneten Reparaturvorgänge auslösen kann. Diese Aussage gilt nicht nur für die untersuchten Leukozyten, sondern auch für die charakterisierten Sarkomzelllinien.
10. Als das wichtigste Resultat der Experimente zur Ganzkörper-/ Ganzknochenmarkbestrahlung ergibt sich die Tatsache, daß selbst unter diesen extremen Bedingungen die Reparaturmechanismen im Organismus funktionieren. Somit konnte bewiesen werden, daß es nicht zur Erschöpfung von Reparaturprozessen kommt.
11. Durch vergleichende In-vitro-/ In-vivo-Experimente wurde bestätigt, daß Zellen nach den gleichen Mustern reparieren. Es konnte für alle Patienten ein biphasischer Reparaturkurvenverlauf unter Ganzkörper-/Ganzknochenmarkbestrahlung festgestellt werden.

Das *Comet-Assay* stellt eine sinnvolle Methode zur Bestimmung der individuellen Strahlenempfindlichkeit von Einzelzellen innerhalb eines komplexen Testsystems dar. Allerdings erscheint es als alleinige Methode zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit eines Patienten im Rahmen der Bestrahlungsplanung als zu ungenau. Außerdem erweist es sich als nicht ausreichend, nur die Strahlenempfindlichkeit des Normalgewebes zu bestimmen. Zur Festlegung der zu applizierenden Dosis ("tailored therapy") muß ebenso die Strahlenempfindlichkeit des zu bestrahlenden Tumorgewebes ermittelt werden. In Zukunft sollten deshalb kombinierte Testsysteme Anwendung finden, welche in der Lage sind, gleichzeitig Chemo- und Strahlenempfindlichkeit zu bestimmen, da die simultane Radiochemotherapie einen großen Stellenwert in der Behandlung einnimmt und weiterhin einnehmen wird.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name: Steffi Ulrike Pigorsch, geb. Burghardt  
Geburtsdatum: 04.07.1972  
Geburtsort: Lutherstadt Eisleben  
Familienstand: verheiratet mit Dr.rer.nat.Christian Pigorsch

## Schulbildung

1979-1989 Spezialschule mit erweitertem Russischunterricht in Eisleben  
1989-1991 Martin-Luther-Gymnasium in Eisleben (Abitur) 1.0

## Hochschulstudium

1991-1997 Studium der Humanmedizin an der MLU Halle  
1993 Physikum  
1994 1. Staatsexamen  
1996 2. Staatsexamen  
1997 3. Staatsexamen (Approbation 21.11.1997)

## Berufliche Entwicklung

1998-1999 Ärztin im Praktikum an der Klinik für Strahlentherapie MLU Halle  
seit 1999 Assistenzärztin an der Klinik für Strahlentherapie MLU Halle

## Praktika

2/1998 Molekularbiologisches Praktikum am Institut für Humangenetik  
der Martin-Luther-Universität Halle (Prof.Dr.Ingo Hansmann)  
10/1998 Praktikum zur Zellkultur im IPK Gatersleben (PD Dr.Anna Wobus)  
3-4/1999 Forschungsaufenthalt am Wadsworth Center in Albany, N.Y.(USA)  
(Prof.Dr.Erasmus Schneider)  
*Apoptoseuntersuchungen in verschiedenen Tumorzellkulturen*

# Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, daß ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Bei dieser Dissertation fanden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel Verwendung. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Steffi Ulrike Pigorsch

Halle/Saale, 25. Mai 2001

# Publikationsliste

1. Burghardt (Pigorsch) S, Hintner I, Löwe S, Gerlach R, Dunst J: Welche Möglichkeiten zur Bestimmung der individuellen Radiosensitivität von Normal- und Tumorgeweben bietet der Comet-Assay? *Strahlentherapie und Onkologie* 174(1) (1998) 109
2. Pigorsch SU, Bache M, Dunst J: Investigation of 2 soft tissue sarcoma cell lines by means of the Comet Assay. *Strahlentherapie und Onkologie* 175(1) (1999) 65
3. Gerlach R, Pigorsch S, Bache M, Dunst J: Untersuchungen zur Strahlenempfindlichkeit zweier Sarkomzelllinien mit Hilfe des Comet Assays und des Zellkoloniebildungstests. *Strahlentherapie und Onkologie* 175(1) (1999) 65
4. Müller AC, Pigorsch S, Dunst J: Radioprotection by Amifostine measured with Comet Assay. *Strahlentherapie und Onkologie* 175(1) (1999) 60
5. Pigorsch SU, Gerlach R, Dunst J: Differences in lymphocyte repair in patients with severe acute and late side effects undergoing radiotherapy. In: Bodis S, Dikomey E, Rodemann P (Hrsg): *Molecular Radiation Biology Oncology*. Paul Zielfleisch, Stuttgart, 2000, S.32
6. Pigorsch S, Hartl M, Damrau M, Dunst J: Zeigen Patienten mit akuten und chronischen Nebenwirkungen unter Radiotherapie Unterschiede in der Reparaturkapazität in-vitro bestrahlter Lymphozyten? *Strahlentherapie und Onkologie* 176(1) (2000) 74
7. Bache M, Pigorsch S, Dunst J, Schmidt H, Rath FW, Taubert H: Inhibierung des G2/M-Blocks und Potenzierung des DNS-Schadens nach Bestrahlung in zwei humanen WTS-Zelllinien mit einer p53-Mutation. *Strahlentherapie und Onkologie* 176(1) (2000) 115
8. Bache M, Pigorsch S, Dunst J, Würfl P, Meye A, Bartel F, Schmidt H, Rath FW, Taubert H: Loss of G2/M arrest correlates with radiosensitization in two human sarcoma cell lines with mutant p53. *International Journal of Cancer* 96 (2001) 110-117

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich mich erstmals um die Eröffnung eines Promotionsverfahrens bewerbe.

Steffi Ulrike Pigorsch

Halle/Saale, dem 25.Mai 2001

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. habil. Jürgen Dunst möchte ich an dieser Stelle für das Wecken des Interesses an diesem Thema danken. Durch die mir gegebenen Freiräume im Labor sowie in der Forschung und die Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen ermöglichte er mir, mich in die Materie der Strahlenbiologie einzuarbeiten. Durch seine konstruktiven Kritiken trug er wesentlich zur Arbeit bei.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Dr.rer.nat. Matthias Bache, der mich über die gesamte Zeit meiner Promotion tatkräftig unterstützte und mir stets durch seine kritischen Ergebnisdiskussionen die notwendige Motivation für weitere Experimente gab.

An dieser Stelle sei den Technischen Assistentinnen Frau Christel Perl und Frau Brigitte Rühlmann aus der Klinik für Strahlentherapie der Universität sowie Frau Ute Rolle und Frau Claudia Vogel aus dem Institut für Pathologie der Universität für ihre Hilfsbereitschaft gedankt.

Die technische Unterstützung bei Veränderungen der Bestrahlungsgeometrie infolge neuer Experimente erfuhr ich dankenswerterweise durch Herrn Dr.rer.nat.Reinhard Gerlach.

Meinem Mit-Doktoranden Herrn Arndt-Christian Müller möchte ich besonders für die gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Unterstützung recht herzlich danken.

Einen maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit verdanke ich der Diskussion mit Naturwissenschaftlern, vor allem meinem Mann Dr.rer.nat. Christian Pigorsch, welche durch ihre kritische Herangehensweise zu einem tieferen Verständnis der Materie beitragen. Aus dieser Zusammenarbeit war es mir möglich neue Sichtweisen auf wissenschaftliche Ergebnisse zu entwickeln. Für seine Geduld und Motivation bis zur Fertigstellung dieser Arbeit danke ich recht herzlich meinem Mann.