

**Quantifizierung von DNA-Schäden an
adhaerenten Zelllinien nach Bestrahlung mit ^{188}Re
bzw. Röntgenstrahlung unter Zugabe von
Methimazol, Nicotinamid und Perchlorat durch
den Comet Assay**

D i s s e r t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung eines doctor medicinae (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden

vorgelegt von
Cindy Kahmann
aus Halberstadt

Dresden 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Kotzerke

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. med. Senekowitsch-Schmidtke

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2008

gez.: Prof. Dr. med. Wozel
Vorsitzender der Promotionskommission

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
2.	Material und Methode.....	2
2.1.	Material	2
2.1.1.	Zelllinien und Kulturmedien	2
2.1.1.1.	FRTL5	2
2.1.1.2.	PC3	3
2.1.2.	Bestrahlungsmodalitäten.....	4
2.1.2.1.	Röntgenstrahlung	4
2.1.2.2.	Radionuklide	4
2.1.3.	Mediatoren	4
2.2.	Methoden.....	6
2.2.1.	Der Comet Assay	6
2.2.2.	Anwendung des Comet Assay.....	7
2.2.2.1.	Vorbereitung der Zellkulturen	8
2.2.2.2.	Vorbereitungen am Versuchstag	8
2.2.2.3.	Bestrahlung mit der Röntgenröhre	9
2.2.2.4.	Bestrahlung mit ^{188}Re	9
2.2.2.5.	Aufarbeitung der Proben.....	10
2.2.2.6.	Elektrophorese und Mikroskopie	11
2.2.3.	^{188}Re -Perrhenat-Uptake	13
2.2.3.1.	Vorbereitung der Zellkulturen	13
2.2.3.2.	Aufarbeitung und Messung der Proben.....	13
2.2.4.	Statistische Auswertung.....	14
3.	Ergebnisse	15
3.1.	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.....	15
3.2.	Externe Bestrahlung von FRTL5 und PC3	17
3.2.1.	Dosis-Wirkung der Röntgenstrahlung auf FRTL5	17
3.2.1.1.	Dosis-Wirkung für FRTL5 bei 4°C/37°C	17
3.2.1.2.	Einfluss des Ablösezeitpunktes auf die Dosis-Wirkung.....	19

3.2.1.3.	Der Effekt von Methimazol, Nicotinamid und Perchlorat bei externer Bestrahlung auf FRTL5, 4°C.....	20
3.2.1.4.	Die Wirkung von Methimazol auf FRTL5 unter externer Bestrahlung bei 4°C/37°C	22
3.2.2.	Dosis-Wirkung von Röntgenstrahlung auf PC3	22
3.2.2.1.	Der Effekt von Methimazol, Nicotinamid und Perchlorat bei externer Bestrahlung auf PC3, 4°C.....	22
3.3.	¹⁸⁸ Re-Bestrahlung von FRTL5 und PC3	23
3.3.1.	Wirkung der ¹⁸⁸ Re-Bestrahlung auf FRTL5	24
3.3.1.1.	Auswirkung von Methimazol, Nicotinamid und Perchlorat auf FRTL5 unter Bestrahlung bei 4°C	24
3.3.1.2.	Beeinflussung des Strahlenschadens durch Methimazol und Perchlorat unter ¹⁸⁸ Re-Bestrahlung bei 4°C/37°C	25
3.3.2.	Wirkung der ¹⁸⁸ Re-Bestrahlung auf PC3	25
3.3.2.1.	Einfluss von Methimazol, Nicotinamid und Perchlorat bei 4°C unter Bestrahlung mit ¹⁸⁸ Re auf PC3	26
3.4.	Uptake von ¹⁸⁸ Re-Perrhenat in FRTL5 bei 4°C und 37°C	26
3.5.	Uptakeausschluss in PC3	27
4.	Diskussion	28
4.1.	Dosis-Wirkungsbeziehung bei der Verwendung des Comet Assays	28
4.1.1.	Standardisierungsmöglichkeit der Auswertung des Comet Assays	28
4.1.2.	Dosis-Wirkungskurve bei externer Bestrahlung	30
4.1.3.	Bestrahlung mit ¹⁸⁸ Re und der Vergleich mit Röntgenbestrahlung	31
4.2.	Uptake von FRTL5 und Beeinflussung der ¹⁸⁸ Re-Perrhenataufnahme.....	34
4.2.1.	Dosimetrie unter Beachtung eines intrazellulären Uptakes.....	39
4.3.	Modulation der Strahlenwirkung.....	40
4.3.1.	Beeinflussung der Wirksamkeit der Röntgenstrahlung	41
4.3.1.1.	Einfluss von Methimazol auf FRTL5 und PC3 unter externer Bestrahlung.....	41
4.3.1.2.	Wirksamkeit von Nicotinamid auf FRTL5 und PC3 bei externer Bestrahlung.....	42
4.3.1.3.	Einfluss von Perchlorat auf FRTL5 und PC3 unter externer Bestrahlung.....	43
4.3.2.	Beeinflussung der Wirksamkeit von ¹⁸⁸ Re.....	43
4.3.2.1.	Einfluss von Methimazol auf FRTL5 und PC3 unter ¹⁸⁸ Re-Bestrahlung	43

4.3.2.2.	Beeinflussung der ^{188}Re -Bestrahlung von FRTL5 und PC3 durch Nicotinamid.....	44
4.3.2.3.	Wirksamkeit von Perchlorat auf die Bestrahlung mit ^{188}Re von FRTL5 und PC3	45
4.4.	Beurteilung von methodischen Limitationen auf die Interpretation der Ergebnisse	45
5.	Zusammenfassung	49
6.	Literaturverzeichnis	51
7.	Anhang	56
7.1.	Reagenzien	56
7.2.	Geräte und sonstige Materialien	57
7.3.	Tabellen zum Uptake	58
7.3.1.	Uptake ^{211}At	58
7.3.2.	Uptake $^{99\text{m}}\text{Tc}$	59
7.3.3.	Uptake ^{131}Iod	59
	Eidesstattliche Erklärung	60
	Danksagung	61
	Thesen	62

Verzeichnis der Abkürzungen

6-W-MTP	6-Well-Mikrotiterplatte
ρ	Dichte
Aq.ad inject	Aqua ad injectabile
Aq.dest.	destilliertes Wasser
C.A.	Comet Assay
cpm	counts per minute
D	Dosis
DCFA-DA	2, 7-Dichlorofluorescein-Diacetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DL	Dosisleitung
DSB	Double Strand Break
DWK	Dosis Wirkungskurve
E	Energie
et al.	et alii
FKS	Fetales Kälberserum
FRTL5	Fischer rat thyroid follicular cell line
HCl	Salzsäure
HWZ	Halbwertszeit
KM	Kulturmedium
LET	linearer Energietransfer
LMP	low melting point
LPO	Lactatperoxidase
Lsg	Lösung
M	Massenelement
MEM-NEA	minimal essential medium-non essential amino acids
MMI	Methimazol
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
NMP	normal melting point
OTM	Olive Tail Moment

PC3	Prostatakarzinomzelle
RBW	Relative biologische Wirksamkeit
RSO	Radiosynoviorthese
SD	Standardabweichung
SSB	Single Strand Break
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
V	Volumen
VK	Variationskoeffizient
ZK	Zellkultur

1. Einleitung

Seit Entdeckung der Röntgenstrahlen durch Wilhelm Conrad Röntgen (1895) [3, 64] und der radioaktiven Strahlung 1896 durch Antoine Henry Becquerel, sowie Pierre und Marie Curie 1898 [31, 46], wurden bis heute stets neue Erkenntnisse im Bereich der Forschung und Anwendung der verschiedenen Strahlenqualitäten gewonnen [15, 52]. Die Anwendung ionisierender Strahlung in der Medizin ist weit verbreitet. Sie wird zunehmend in der Diagnostik, Therapie und Nachsorge von Tumoren eingesetzt.

Die Bestrahlung von Zellen führt in erster Linie zur DNA-Schädigung (Einzel-, Doppelstrangbrüche, Chromosomenaberrationen). Zum größten Teil entstehen DNA-Schäden aufgrund der Radiolyse des Wassers im Zyto- und Karyoplasma (indirekte Strahlenschäden), ein kleinerer Teil der Strahlenenergie schädigt den Zellkern direkt [1, 25, 66]. Dieser Effekt ist bei der Bestrahlung von Tumorzellen erwünscht, im Normalgewebe ein unerwünschter Nebeneffekt. Mit dem Comet Assay steht eine Methode hoher Sensitivität zur Verfügung, die es erlaubt, DNA-Schäden an nahezu jeder eukaryotischen Zelle darzustellen [44, 48, 50].

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss zweier unterschiedlicher Strahlenqualitäten, Röntgen- und Beta-Strahlung, auf die Rattenschilddrüsenzelllinie FRTL5 und die humane Prostatakarzinomzelllinie PC3 mit dem Comet Assay zu untersuchen. Außerdem sollte geprüft werden, ob sich das Ausmaß des Strahlenschadens durch Zugabe strahlenmodulierender Substanzen - Methimazol, Nicotinamid und Perchlorat- verändert.

FRTL5 wurde gewählt, da es sich um eine „natürlicherweise“ Natrium-Jodid-Symporter (NIS) positive Zelllinie handelt [6]. Der NIS ist ein membranständiges Glykoprotein [16], zwei Natrium- und ein Jodidion werden durch einen sekundär aktiven Transport in die Schilddrüsenzelle aufgenommen. Der NIS ist durch Perchlorat (ClO_4^-) oder Thiocyanat (SCN^-) hemmbar [70]. Weitere Substrate für den NIS neben Jodid sind Anionen wie Perrhenat oder Pertechnetat. Durch Hemmung des NIS mittels Perchlorat sollte der durch Perrhenat verursachte Strahlenschaden an FRTL5 reduzierbar sein. PC3 als NIS-negative Zelllinie diene der Kontrolle.

Methimazol werden radikaleliminierende Eigenschaften zugeschrieben [13], diese sollten an beiden Zelllinien zur Reduzierung des DNA-Schadens führen.

Nicotinamid ist ein in der Tumorthherapie eingesetzter Sensitizer [67] - mit Hilfe des Comet Assays sollte versucht werden, diese Eigenschaft im Sinne einer Erhöhung der DNA-Schädigung darzustellen.

2. Material und Methode

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien und Kulturmedien

2.1.1.1. FRTL5

Die Fischer rat thyroid follicular cell line (FRTL5) sind adherent wachsende Zellkulturen epithelialen, nicht tumorigenen Ursprungs einer Ratte. Als Kulturmedium (KM) wurde F12 Nutrient Mixture von Gibco (Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland) mit folgenden Zusätzen

FKS	Biochrom KG Heidelberg, Deutschland
Gly-His-Lys	Sigma-Aldrich GmbH Deisendorf, Deutschland
Hydrocortison	Sigma-Aldrich GmbH Deisendorf, Deutschland
Insulin (bovine)	Biochrom KG Heidelberg, Deutschland
Somatostatin	Sigma-Aldrich GmbH Deisendorf, Deutschland
Transferrin	Sigma-Aldrich GmbH Deisendorf, Deutschland
TSH	Sigma-Aldrich GmbH Deisendorf, Deutschland

und nachfolgender Zusammensetzung verwendet:

FKS	25 ml/500 ml
Gly-His-Lys	100 µl/500 ml
Hydrocortison	50 µl/500 ml
Insulin	500 µl/500 ml
Somatostatin	50 µl/500 ml
Transferrin	500 µl/500 ml
TSH	2,5 ml/500 ml

Die Kultivierung erfolgte in 160 ml Zellkulturflaschen (ZK-Flaschen) von Nunc (Nunc Surface, Nunc VWR International GmbH) bei Wachstumsbedingungen von 5 % CO₂, 95 % Luft in 37°C-Umgebung. Die Verdopplungszeit betrug 30-40 h [2]. Bei 90 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert, die Ablösung erfolgte mit Accutase. Die Zellkultur wurde über insgesamt 10 Passagen verwendet. Eine Erneuerung des KM erfolgte zwei Mal pro Woche.

2.1.1.2. PC3

PC3 sind adherent wachsende, epitheliale, humane Zellen eines Prostataadenokarzinoms Grad IV [37, 38]. Ihre Kultivierung erfolgte mit RPMI 1640 von Biochrom in Kulturflaschen (Nunc). Dem KM wurde

FKS	Biochrom KG Heidelberg, Deutschland
MEM-NEA	Biochrom KG Heidelberg, Deutschland

in folgender Dosierung zugesetzt:

FKS	45 ml/500 ml
MEM-NEA	5 ml/500 ml

Ein Mediumwechsel erfolgte 2- bis 3-mal die Woche, bei Erreichen von ca. 90 % Konfluenz wurden die Zellen nach Ablösung durch Trypsin-EDTA erneut verteilt. Für die Durchführung der Experimente wurden die Zellen über 10 Passagen genutzt. Die Verdopplungszeit betrug 33 h [38].

2.1.2. Bestrahlungsmodalitäten

2.1.2.1. Röntgenstrahlung

Röntgenröhre	Xylon Y.TU 320-D01/03 International X-Ray GmbH Hamburg, Deutschland
Dosisleistungsmessgerät	Universaldosimeter PTW-Unidos Firmware No. 2.20 PTW Freiburg, Deutschland

Die Röntgenröhre des OncoRay (Zentrum für Innovationskompetenz, Medizinische Fakultät, TU Dresden) konnte für die Versuche verwendet werden. Sie wies bei einer Beschleunigungsspannung von $U = 200 \text{ kV}$ und einem Röhrenstrom von $I = 20 \text{ mA}$ eine Dosisleistung (DL) von $1,32 \text{ Gy/min}$ auf.

2.1.2.2. Radionuklide

Rhenium-188 zerfällt unter Freisetzung von β - und γ -Strahlung. Es wird der Gruppe der β -Strahler zugeordnet. Die mittlere Energie der beiden β -Komponenten beträgt $0,761 \text{ MeV}$, die der γ -Komponente 155 keV . Das Nuklid wurde in Form von Perrhenat, gelöst in $0,9 \%$ NaCl, aus einem $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ -Generator (Polatom, Otwock-Swierk, Polen) in der Klinik für Nuklearmedizin (Dresden, Deutschland) eluiert. Seine physikalische Halbwertszeit (HWZ) beträgt 17 h .

2.1.3. Mediatoren

Perchlorat und Methimazol (MMI) wurden aufgrund ihrer Anwendung als Thyreostatika ausgewählt.

Perchlorat wirkt über eine kompetitive Hemmung des Natrium-Iodid-Symporters thyreostatisch und radioprotektiv [65]. Es besitzt keinen Effekt auf die Genexpression der NIS RNA. Die Funktionsweise des NIS beruht auf einem durch die Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhaltenen, zelleinwärts gerichteten Natriumgradienten [63]. Mit 2 Na^+ -Ionen kann ein Iodid-Anion in die Schilddrüsenzelle aufgenommen werden. Dieser Transporter arbeitet sekundär aktiv. Da einige Nuklide in ihrer Struktur dem Iodid-Anion ähnlich sind, werden auch sie mit unterschiedlicher Affinität in die Schilddrüsenzelle transportiert [65]. Der NIS ist zum einen indirekt über die

Na⁺/K⁺ATPase durch Oubain, zum anderen direkt durch Perchlorat (ClO₄⁻) oder Thiocyanat (SCN⁻) hemmbar [70].

Methimazol zeigt neben den thyreostatischen (Iodinationshemmung der Peroxidase, Coupling von Iodthyrosin an Iodthyronin) auch immunmodulatorische Eigenschaften [4]. Es inhibiert z.B. die Antikörperproduktion in Interaktion mit Antigen-präsentierenden Monozyten [69] und die Transkription des ICAM-1-Gens [39]. Des Weiteren weist Methimazol antioxidative Eigenschaften auf. Über einen erleichterten Elektronentransfer von NADPH zu H₂O₂ mittels Thioredoxin oder Glutathion wird eine schnellere Elimination von H₂O₂ erreicht [39].

Das Aminderivat der Nicotinsäure ist Nicotinamid, auch als Vitamin B3 bezeichnet. Unter hypoxischen Bedingungen weist Nicotinamid radiosensibilisierende Wirkung auf [10, 73].

Vor ihrer Anwendung wurden die Substanzen auf Toxizität mittels Konzentrationsabstufung und anschließender Auswertung mit dem Comet Assay (C.A.) getestet.

In Konzentrationen von 0,001 M, 0,01 M, 0,02 M, 0,04 M, 0,1 M und 0,2 M erfolgte die Zugabe der Mediatoren, gelöst in Aqua ad injectabile (Aq. ad inject), zu den bereits 2 Tage vorher auf 6-Well-Mikrotiterplatten (6-W-MTP) verteilten Zellen. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Es konnte anschließend die Morphologie der Zellen mittels Lichtmikroskop und deren DNA-Schaden anhand des Comet Assays beurteilt werden. Bis zur 0,04 M Lösung waren die Zellen lichtmikroskopisch unauffällig, bei höheren Konzentrationen erschienen die Zellen kugelförmig und lösten sich vom Untergrund. Auch die Beurteilung der Zellen mit Hilfe des C.A. zeigte bis 0,04 M keine wesentlichen DNA-Schäden, sodass für die folgenden Experimente die höchstmögliche Konzentration der Mediatoren von 0,04 M eingesetzt wurde.

2.2. Methoden

2.2.1. Der Comet Assay

Die Entwicklung des alkalischen Comet Assays (single cell gel electrophoresis) vollzog sich über mehrere Jahre, erfuhr immer wieder Änderungen in seiner Durchführung und wurde hinsichtlich seiner Anwendbarkeit z.B. im Bereich des Biomonitoring von verschiedenen Arbeitsgruppen geprüft [44, 50]. Er zeichnet sich durch seine Sensitivität bezüglich DNA-Schäden aus und ist für nahezu alle eukaryoten Zellarten anwendbar.

Die ersten waren Rydberg und Johanson, die DNA-Einzelstrangbrüche an isolierten Lymphozyten 1978 nachwiesen. Sie erfassten die DNA-Schäden quantitativ, im Fluoreszenzphotometer stellten sich mit Acridinorangefärbung Doppelstrang-DNA grün und Einzelstränge rot dar [44].

Ostling und Johanson entwickelten darauf basierend 1984 die Mikrogelelektrophorese, welche es ermöglichte, negativ geladene DNA-Bruchstücke aus dem Nukleus in Richtung Anode wandern zu lassen [51].

Durch Singh et al. war der Comet Assay ab 1988 auch im alkalischen Milieu anwendbar und nützlich für die Detektion von DNA-Einzelstrangbrüchen und Reparatur [57]. Die Färbung erfolgte erstmals mit Ethidiumbromid. In Anlehnung an deren Protokoll erfolgte die Anwendung des Comet Assays in dieser Arbeit.

Olive et al. beschäftigten sich ebenfalls mit der alkalischen Variante des Comet Assays und führten alkalische Lyse und Elektrophorese als Erweiterung dieser Technik ein [47]. Sie zeigten unter anderem, dass der Zellzyklus keinen Effekt auf die Darstellung der DNA-Schäden mit dieser Methode hat [49]. Somit scheint der Comet Assay geeignet für den Einsatz bei unsynchronisierten Zellkulturen.

Der alkalische Comet Assay ermöglicht die Darstellung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen, Crosslinks und alkalilabilen (= abasische) Stellen aufgrund der Möglichkeit der DNA-Entwindung [43]. Nach Elektrophorese stellt sich im fluoreszenzmikroskopischen Bild die intakte DNA als Kopf eines „Kometen“ dar, während die geschädigte DNA dessen Schweif bildet.

2.2.2. Anwendung des Comet Assay

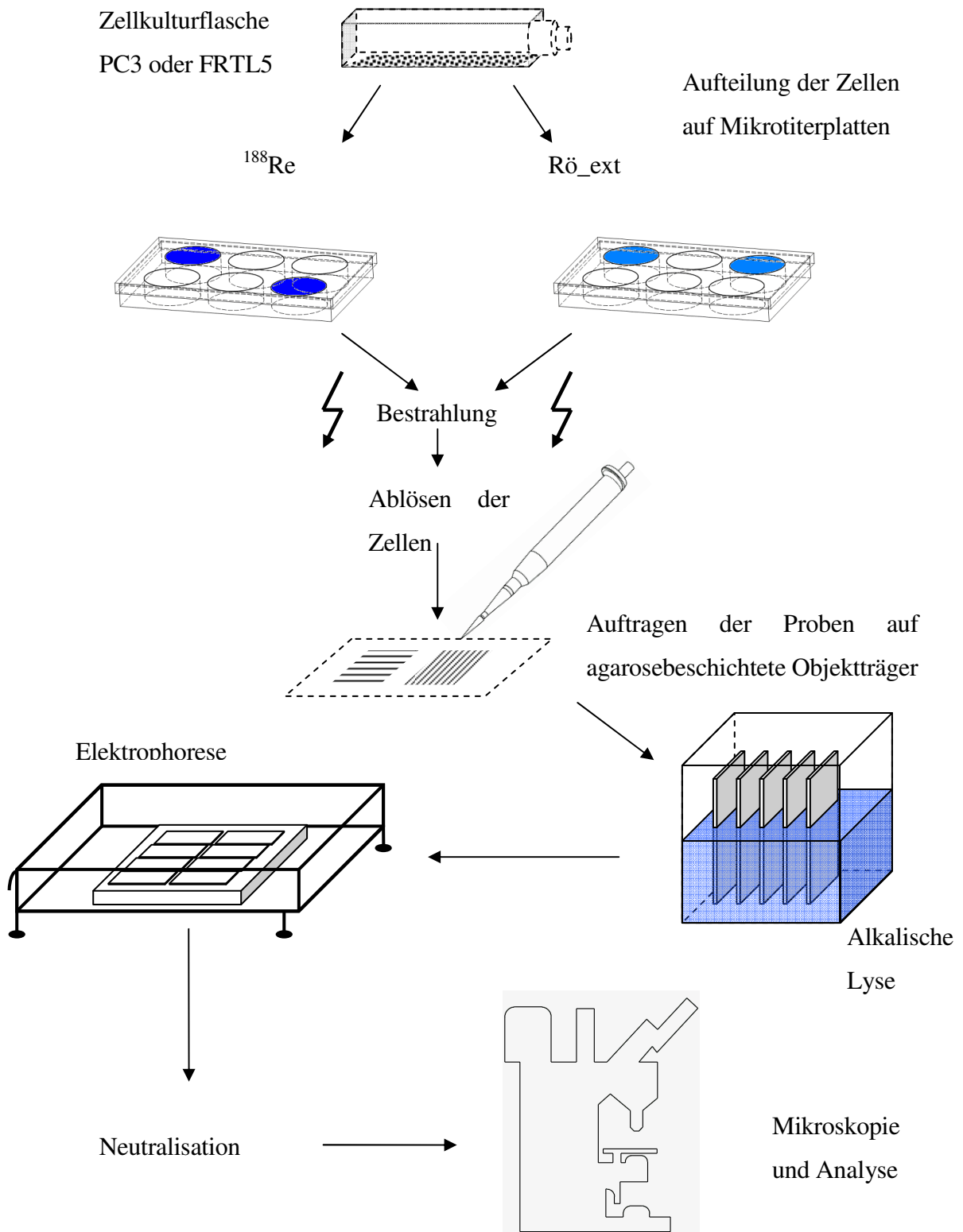


Abb.1 Schematische Darstellung zum Ablauf des Comet Assay Protokolls

2.2.2.1. Vorbereitung der Zellkulturen

2 Tage vor Versuchsbeginn wurden 1,5 – 2 Mio. Zellen pro Well der FRTL5 Zelllinie auf 6-W-MTP verteilt. Nach der Abnahme des alten KM wurden die Zellen mit 5 ml warmen PBS (Ca^{2+} und Mg^{2+} frei, Biochrom KG, Heidelberg, Deutschland) gewaschen. Anschließend wurden 3 ml Accutase (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) pro 160 ml ZK-Flasche, zum Ablösen der FRTL5 zugefügt und, sobald sich die Zellen in 10 ml Suspension befanden, F12 Nutrient Mixture dazugegeben. Die Zellsuspension konnte nun in ein steriles Falconröhrchen überführt und ein Aliquot von 500 μl für die Zellzahlbestimmung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert werden. Diese erfolgte mittels Casy Cell Counter (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland). In insgesamt 2 ml KM pro Well wurden die 1,5–2 Mio. Zellen zum Anheften und Proliferieren in den Inkubator (5 % CO_2 , 37°C) gestellt.

Analog zur FRTL5-Zelllinie erfolgte das Aufteilen von PC3. Das Ablösen erfolgte im Unterschied zu FRTL5 mit 3 ml Trypsin-EDTA (Biochrom KG, Heidelberg, Deutschland) pro 160 ml ZK-Flasche. 10 ml RPMI 1640 dienten der anschließenden Neutralisation. Die Zellzahl wurde ebenso mit dem Casy Cell Counter bestimmt und 4×10^5 Zellen pro Well verteilt. Die Zellsuspension wurde auf 2 ml aufgefüllt, anschließend kamen die Kulturplatten in den Inkubator. In Abb.1 ist der Ablauf des Comet Assay Protokolls dargestellt.

2.2.2.2. Vorbereitungen am Versuchstag

Zuerst wurden die Mediatorlösungen hergestellt. Dafür wurden 92,1 mg Methimazol (min. 98 %, Sigma-Aldrich GmbH, Deisendorf, Deutschland) und 97,6 mg Nicotinamid (Sigma-Aldrich, Deisendorf, Deutschland) abgewogen und in je 4 ml Aq. ad inject gelöst. 326 μl Perchlorat (Natriumperchlorat, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) wurde zu 3674 μl Aq. ad inject (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) pipettiert. Anschließend erfolgte die Sterilfiltration der Lösungen mittels Mikrofilter (Sterilfilter Milles[®]-GS 0,22 μm). Vor Zugabe der Lösungen zu den ZK wurde das KM erneuert (1,6 ml/well). 400 μl Methimazol, Nicotinamid oder Perchlorat wurden pro Well zugesetzt, sodass sich eine Konzentration von 0,04 M je Mediator ergab. Die Kontrolle erhielt die gleiche Menge Aqua ad inject. Die MTP wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde die low melting point Agarose (LMP-Agarose, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) zu je 120 μl /Eppendorfgefäß im Thermomixer auf 95°C erhitzt und anschließend auf 37°C heruntergekühlt. Anschließend wurden die mit normal melting point (NMP) Agarose NEEO (1,5 % in PBS, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe,

Deutschland) beschichteten Objektträger beschriftet und die Lyselösung hergestellt. Die Zusammensetzung der Lyselösung war folgende:

pro 1000 ml

2,5 M NaCl	146,1 g
100 mM Na ₂ EDTA (372 g/mol)	37,2 g
10 mM Tris	1,2 g
NaOH Plätzchen	ca. 8 g bis pH 10 eingestellt ist

Der Ansatz wurde mit 890 ml dH₂O aufgefüllt und ergab die Stammlyselösung.

Am Versuchstag wurden 1 ml Triton X-100 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) und 10 ml DMSO (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zu 89 ml Stammlösung gegeben und diese bei 4°C gelagert.

Nach Ablauf der Mediator-Inkubationszeit kamen die 4°C-Proben für 15 min in den Kühlschrank (4°C).

2.2.2.3. Bestrahlung mit der Röntgenröhre

Der Zell-Transport erfolgte gekühlt zur Röntgenröhre. Es konnten immer zwei 6-Well-Platten auf einmal bestrahlt werden. Um die Kühlung der Proben während der Bestrahlung zu gewährleisten, wurden vorgekühlte Gelkissen unter die MTP gelegt. Bestrahlt wurde mit 5 und 15 Gy. Bei einer mit Ionisationskammer gemessenen DL von 1,32 Gy/min war für eine Dosis von 5 Gy eine Bestrahlungszeit von 3:49 min und für 15 Gy 11:26 min erforderlich.

2.2.2.4. Bestrahlung mit ¹⁸⁸Re

¹⁸⁸Re wurde den Zellen in Form von Perrhenat zugeführt. Dafür wurden 100 µl Perrhenat je Probe mit einer Aktivität von 100 MBq bzw. 300 MBq in die Wells zu 2 ml KM pipettiert. Ziel war es, das gleiche Dosisverhältnis analog zur Röntgenröhre zu erreichen. Eine einzelne Kavität einer 6-W-MTP weist einen Durchmesser von 36 mm auf, es ergab sich eine Füllhöhe von 2,1 mm. Die Bestrahlungszeit betrug 1 h bei 4°C bzw. 37°C und erfolgte im Labor der Klinik für Nuklearmedizin Dresden.

¹⁸⁸Re wandelt sich über den Betazerfall in ¹⁸⁸Os um. Die maximale Energie der dabei emittierten Elektronen beträgt 2120 keV, die mittlere Energie 765 keV. Aufgrund der hohen

Wechselwirkungswahrscheinlichkeit von Elektronen mit Materie werden diese im Wasser sehr schnell abgebremst, so dass die mittlere Betareichweite nur wenige Millimeter beträgt. Dabei kommt es zur vollständigen Energieabsorption im Medium. In einem Volumen von 1 cm³ sind beispielsweise $8 \cdot 10^{10}$ Zerfälle erforderlich, um eine Dosis von 10 Gy zu applizieren.

Die schädigende Wirkung der ionisierenden Strahlung ist umso größer, je höher die lokal applizierte Dosis ist. Dabei bezeichnet die Dosis D die in einem Massenelement dm absorbierte Energie dE .

$$D = \frac{dE}{dm} = \frac{dE}{\rho \cdot dV}$$

Bei einer Dichte von 1 g/cm³ entspricht 1 Gy einer Energieabsorption von 1 mJ/ml. Zu beachten ist, dass die Dosis von dem jeweils betrachteten Volumen abhängig ist. Das MIRD-Kugelmodell berücksichtigt die Tatsache der Energieabsorption. Mit dessen Hilfe lässt sich die Dosis innerhalb einer homogen mit Aktivität befüllten Kugel allein aus einem nuklidspezifischen S -Wert und der Aktivität berechnen [21, 69]. Für den Fall der Zellbestrahlung am Boden (adhaerente Zellkulturen) einer MTP ist näherungsweise mit der halben MIRD-Dosis zu rechnen, da die Strahlenexposition nur aus dem Medium oberhalb der Zellen erfolgt und der Beitrag unterhalb der Zellen fehlt. Ein somit entstehender Dosisabfall am Rand oder auch ein intrazellulärer Uptake wird durch das MIRD-Modell nicht berücksichtigt.

2.2.2.5. Aufarbeitung der Proben

Die Probenaufarbeitung nach Bestrahlung war für beide Bestrahlungsqualitäten identisch. In der Sterilbank wurde das KM abgesaugt, die Wells zweimal mit je 1 ml gekühltem PBS gewaschen und 0,5 ml Trypsin (PC3) oder Accutase (FRTL5) je Well zur Ablösung der Zellen hinzugefügt. Die MTP verblieben während der Ablösezeit im Brutschrank. Nach 5 min konnten die PC3 Zellen weiterverarbeitet werden, die FRTL5 lösten sich hingegen sehr variabel erst nach 30 bis 50 min ab.

Die sich in Suspension befindlichen Zellen wurden in 0,5 ml KM aufgenommen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt.

Aus jeder Probe erfolgte eine Doppelbestimmung. 15 µl je Probe wurden zu 120 µl LMP-Agarose gegeben und 100 µl davon auf agarosebeschichtete Objektträger aufgetragen. Nach Festwerden der Agarose, konnten Objektträger in die vorbereitete kalte Lyselösung gestellt werden. Die Zellen verblieben zumindest für 1 h [48, 60] in der Lyselösung. Dies diente dem Auflösen der Zellwandstrukturen, sodass allein die DNA, eingebettet in Agarose, übrigblieb.

Die Vitalität der Zellen konnte mittels Casy Cell Counter bestimmt werden. Die Gesamtverarbeitungszeit bis zur Inkubation der Objektträger in Lyselösung betrug je nach Ablösezeit

50 bis 60 min. Während dieser Zeit fand eine Reparatur statt, die jedoch methodisch bedingt nicht quantifiziert werden konnte.

2.2.2.6. Elektrophorese und Mikroskopie

Je 12 Objektträger kamen in eine in Eis eingebettete Elektrophoresekammer. Anschließend wurden ca. 1,5 l Elektrophoresepuffer (gekühlt) langsam eingefüllt. Es wurde eine Stromstärke $I = 300 \text{ mA}$ und eine Spannung $U = 25 \text{ V}$ eingestellt. Die im alkalischen Milieu nötige Entwindungszeit (Denaturierung/Unwinding, Expression von Einzelstrangbrüchen (SSB) und alkalilabilen Läsionen) betrug 20 min, daran schloss sich die Elektrophorese mit einer Laufzeit von 30 min an. Die negativ geladene DNA wandert im elektrischen Feld in Richtung positiv geladener Anode, je kleiner das DNA-Bruchstück, desto besser die Migration. So entsteht die typische Form eines Kometen: der Kopf enthält die intakte nicht migrationsfähige DNA, der Schwanz besteht aus deren Bruchstücken.

Nach Ablauf der eingestellten Elektrophoresedauer konnten die Objektträger einzeln mit der Pinzette entnommen, kurz in Neutralisationspuffer geschwenkt und waagrecht auf Lagerracks positioniert werden. Es erfolgte dreimaliges Waschen mit je 1 ml Neutralisationspuffer. Zuletzt wurden die agarosebeschichteten Objektträger noch einmal mit 1 ml dH_2O gewaschen und dann über 24 h bei Raumtemperatur getrocknet.

Die für Elektrophorese und Neutralisation verwendeten Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Elektrophoresepuffer:

Aus den Stammlösungen:

10 N NaOH	400 g/1000 ml dH_2O
200 mM Na_2EDTA (372 g/mol)	14,89 g/200 ml dH_2O , pH 10

(beide Chemikalien von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

konnte der Puffer mit

NaOH	600 ml
Na ₂ EDTA	100 ml

hergestellt werden, indem das Volumen auf 20 l mit dH₂O aufgefüllt worden ist. Der pH sollte höher als 13 sein und die Leitfähigkeit 60-65 S/m (Siemens pro Meter) betragen. Beide Werte wurden direkt nach Herstellung durch ein pH-Meter (Schott-Instruments GmbH, Mainz, Deutschland) und Konduktometer (LF 197, WTW-GmbH, Melsungen, Deutschland) geprüft.

Neutralisationspuffer:

Für den Neutralisationspuffer wurde

Tris Carl Roth GmbH+ CoKG, Karlsruhe, Deutschland	48,5 g
---	--------

auf 900 ml mit dH₂O aufgefüllt und mit rauchender HCl auf pH 7,5 eingestellt. Anschließend erfolgte die Einstellung des Zielvolumens von 1000 ml mit dH₂O.

Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes (Axioskop, Zeiss, Jena, Deutschland, Vergrößerung 20x) konnten nach Anfärben der DNA mit 50 µl Ethidiumbromid (1 mg in 10 ml Aq. dest., Gebrauchslösung verdünnt im Verhältnis 1:10 mit dH₂O, Carl Roth GmbH + Co.KG, Darmstadt, Deutschland) die Kometen ausgewertet werden. Als Auswertungssoftware wurde Komet GLP 6.0 (Kinetic Imaging Ltd, USA) benutzt.

Pro Objektträger wurden 50 Zellen analysiert. Anschließend wurde der Farbstoff mit dH₂O und Ethanol (absoluter Alkohol, Mallincrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande) abgespült und der Objektträger getrocknet. Die entstandenen Datensätze konnten im Anschluss mit Analysis Makro 2000 in Exceldateien konvertiert werden.

Auswertungskriterium dieser Arbeit war das Olive Tail Moment (OTM), welches das Produkt aus dem Anteil der DNA im Schweif und der Abstand zwischen den Zentren in Kopf und Schweif ist.

OTM= Anteil der DNA im Schweif x Abstand zwischen den Zentren in Kopf und Schweif

Die folgenden Abbildungen zeigen eine unbestrahlte FRTL5 und eine Zelle nach 15 Gy Röntgenbestrahlung.

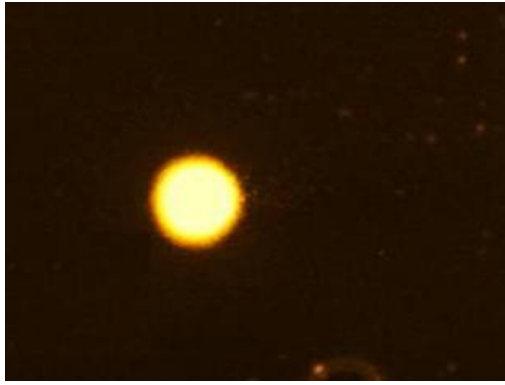


Abb.2 0 Gy FRTL5

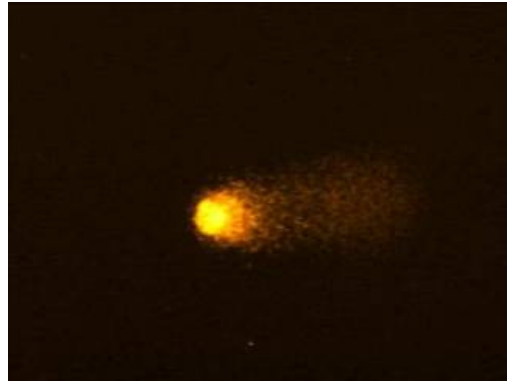


Abb.3 15 Gy FRTL5

2.2.3. ^{188}Re -Perrhenat-Uptake

2.2.3.1. Vorbereitung der Zellkulturen

Die Zellverteilung erfolgte analog zum C.A. Versuch, wie unter 2.2.2.1. dargestellt. Die Zellzahl betrug 1 Mio. Zellen pro Well.

Am Versuchstag wurde das alte KM durch 1,6 ml frisches ersetzt und 400 μl Methimazol, Perchlorat oder Aq.ad inject dazugegeben. Die Inkubationszeit betrug identisch zu den Bestrahlungsversuchen 1 h. Danach kam die 4°C-Probe für 15 min in den Kühlschrank. Zwischenzeitlich wurde den 37°C-Proben 100 μl der entsprechenden Radionuklidlösung (^{188}Re , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{211}At , ^{131}I) zugesetzt und über 1 h inkubiert (37°C). Die Aktivität betrug dabei im Mittel 100 kBq/100 μl . Die 4°C-Proben erhielten die gleiche Menge Aktivität und standen anschließend 1 h bei 4°C im Kühlschrank.

Für die Uptakeversuche wurden FRTL5 verwendet. Eine Kontrolle wurde auch mit PC3 durchgeführt, um eine Nuklidaufnahme auszuschließen und den nach dem Waschen verbleibenden Gehalt an Radioaktivität beurteilen zu können.

2.2.3.2. Aufarbeitung und Messung der Proben

In der weiteren Verarbeitung der Zellproben wurden immer erst die 37°C-Proben verarbeitet.

Als erstes wurde der Überstand abgenommen, dann zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und zuletzt 1 ml 0,1 M NaOH pro Well auf die Zellen gegeben. Mit dem Zellschaber konnten die lysierten Zellen vollständig vom Plattenboden gelöst und die Suspension in Messröhrchen pipettiert werden. Überstand, Waschlösung und Zellsuspension wurden für jedes Well getrennt in Messröhrchen überführt.

Zur Kontrolle wurden 3 Messröhrchen mit je 2 ml NaCl und je 100 µl Nuklidlösung gemessen. Mit einem ungefüllten Röhrchen konnte die Hintergrundaktivität bestimmt werden.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Gammacounter über eine Minute (Cobra II, Autogamma, Packard[®], A Canberra Company, Australien). Über eine Minute wurde die Anzahl der Zerfälle des Radionuklids gemessen.

2.2.4. Statistische Auswertung

Der Comet Assay wurde in drei unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmung durchgeführt. Mittelwert und Standardabweichung (SD) der Diagramme ergaben sich daher aus 300 einzelnen OTM-Werten. Die Berechnung dieser Parameter erfolgte mit dem Programm Excel. Unter Verwendung von SPSS konnte eine Normalverteilung der OTM-Werte bestätigt werden. Zur Berechnung der Signifikanz wurden die aus den 300 Einzel-OTM erhaltenen Mittelwerte herangezogen. Bei $p < 0,05$ im Student's t-Test (ungepaart, Excel) wurde ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Versuchsgruppen angenommen.

Für die Uptakeversuche wurde der prozentuale Aktivitätsgehalt des Zellpellets bezogen auf die Ausgangsaktivität angegeben. Es wurden drei unabhängige Versuche mit Dreifachbestimmung durchgeführt. Aus den Triplets eines Versuchstages wurden Mittelwerte gebildet und diese ins Verhältnis zur Ausgangsaktivität gesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Um die Schwankungsbreite des OTM innerhalb einer Zellprobe zu bestimmen, wurden je 10 Objektträger pro Dosis mit Aliquots aus derselben Probe einer FRTL5-Zellkultur nach externer Röntgenbestrahlung beschichtet. Diese Objektträger wurden anschließend durch zwei Auswerter unabhängig voneinander bewertet (Tab.1).

Tab.1 Reproduzierbarkeit und Inter-/Intraobservervariabilität bei 0 Gy, 5 Gy, 15 Gy

	Auswerter 1			Auswerter 2		
	0 Gy	5 Gy	15 Gy	0 Gy	5 Gy	15 Gy
1	0,51	2,83	5,30	1,09	2,43	6,38
2	0,68	3,04	6,77	0,83	2,48	7,28
3	0,33	2,39	5,54	0,53	2,19	6,21
4	0,19	2,58	4,98	0,75	2,55	6,91
5	0,26	1,99	6,48	1,17	1,87	7,56
6	0,70	1,89	5,88	0,68	1,91	6,80
7	0,50	2,40	5,37	0,49	2,87	6,63
8	0,94	2,11	6,93	0,82	2,12	8,11
9	0,38	2,36	6,82	0,60	2,47	7,16
10	0,96	1,56	7,74	0,60	2,21	8,88
MW	0,54	2,31	6,18	0,76	2,31	7,19
SD	0,27	0,44	0,90	0,23	0,31	0,82
VK	0,50	0,19	0,15	0,30	0,13	0,11

Die Analyse der 0-Werte ergab kaum Inter-/Intraobservervariabilität. Die Mittelwerte aus allen 10 Proben unterschieden sich nicht signifikant. Auswerter 2 erhielt im Mittel höhere OTM-Werte als Auswerter 1. SD und Variationskoeffizient (VK) wichen ebenfalls nicht stark voneinander ab. Bei 5 Gy stimmten MW, SD und VK sehr gut überein. Auch in den Ergebnissen der einzelnen Objektträger zeigte sich eine gute Konkordanz. Die MW der beiden Auswerter unterschieden sich nicht signifikant.

Bei 15 Gy wichen die MW der beiden Auswerter geringfügig aber signifikant voneinander ab. SD und VK hingegen zeigten eine sehr gute Übereinstimmung. Die von beiden Auswertern analysierten Werte sind in Abb.4 gegeneinander aufgetragen. Auswerter 1 wurde auf der x-Achse, Auswerter 2 auf der y-Achse abgebildet. Durch Einfügen einer Regressionsgeraden war erkennbar, dass die einzelnen OTM-MW nicht stark um diese Gerade streuten und die gewählten Dosisbereiche gut voneinander abgrenzbar waren.

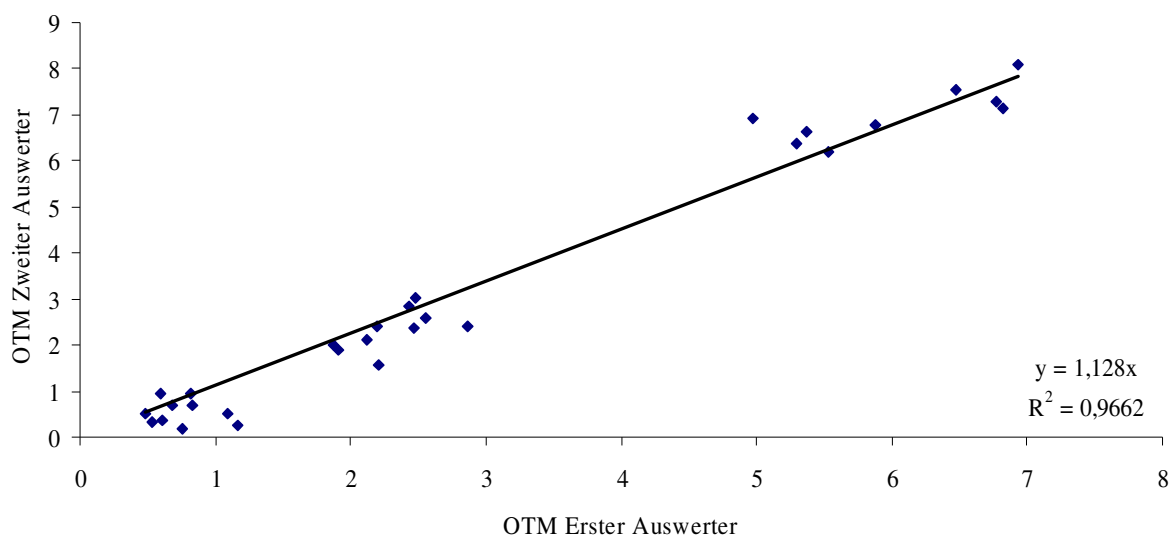


Abb. 4 Graphische Darstellung der OTM-Werte von 0 Gy, 5 Gy und 15 Gy der für zwei Auswerter

3.2. Externe Bestrahlung von FRTL5 und PC3

Die Dosispunkte für die durchgeführten Bestrahlungen betragen 5 und 15 Gy. Dies begründete sich aus den Vorversuchen, bei denen die Dosisabstände in 2- und 2,5 Gy Schritten gewählt worden. Zwischen der unbestrahlten Kontrolle und 5 Gy bzw. 5 und 15 Gy zeigten sich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der Strahlenschädigung der Zellen. Diese Dosispunkte wurden daher für die Beurteilung der Wirkung der zugegebenen Mediatoren verwendet. Nach Zugabe von Methimazol, Nicotinamid und Perchlorat in einer Konzentration von 0,04 M (je 400 μ l zu 1,6 ml KM, siehe auch 2.2.2.2.) und einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C erfolgte die externe Bestrahlung der Zellkulturen mit der Röntgenröhre. Nach Auftragen der Proben auf die agarosebeschichteten Objektträger und Elektrophorese konnten die Präparate durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden. Pro Objektträger wurden 50 Zellen ausgemessen. Analyseparameter war das OTM. In den Diagrammen sind MW und SD aus mindestens 300 OTM-Einzelwerten dargestellt.

3.2.1. Dosis-Wirkung der Röntgenstrahlung auf FRTL5

3.2.1.1. Dosis-Wirkung für FRTL5 bei 4°C/37°C

Der Einfluss des Röhrenstroms wurde durch Variation der Bestrahlungszeit zwischen 11:26 min und 1 h für 15 Gy und 34:13 min und 1 h für 45 Gy bei 4°C und 37°C geprüft. Für das Erhalten der 4°C-Dosis-Wirkungskurve (DWK) in Abb.5 wurden noch zwei weitere Dosispunkte bei 5 Gy (3:39) und 25 Gy (19:01) verwendet. Den Vergleich zwischen verkürzter und Bestrahlungsdauer über eine Stunde mit entsprechend vermindertem Röhrenstrom bei konstanter Röhrenspannung zeigt Abb.6. Für die in Abb.6 und Abb.7 (4°C/37°C) dargestellten OTM-Werte wurden FRTL5 über eine Stunde mit unterschiedlichen Röhrenstromstärken bestrahlt. Zum Erreichen von 15 Gy betrug der Röhrenstrom 3,8 mA bei 200 kV, für 45 Gy 11,4 mA bei 200 kV.

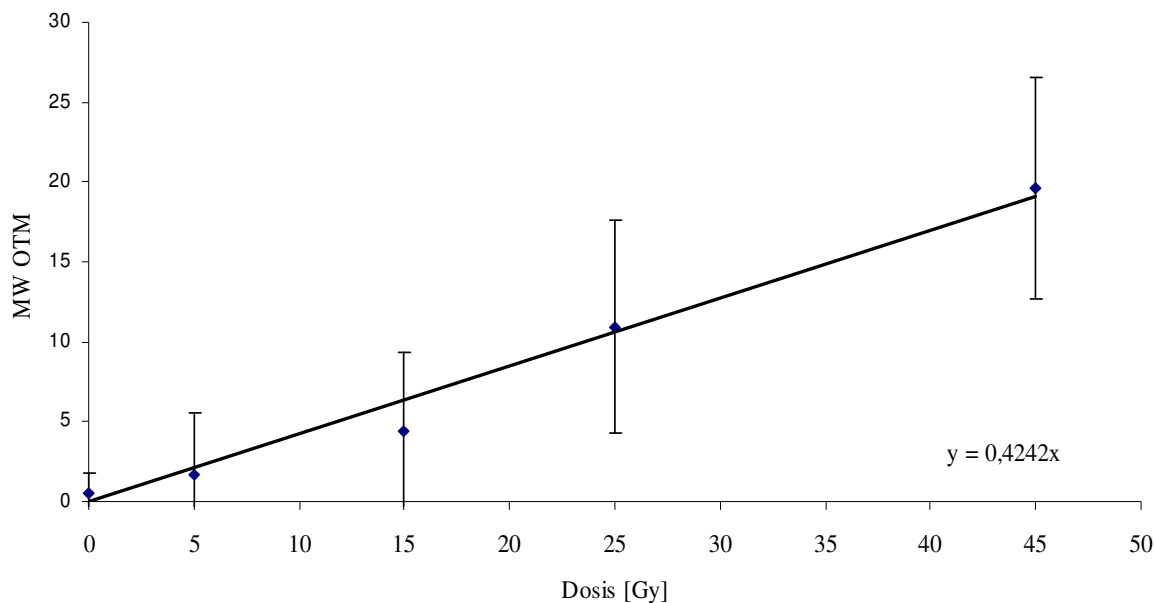


Abb.5 DNA-Schaden (OTM) von FRTL5-Zellen in Abhängigkeit von der Dosis, 4°C Röntgenröhre, DL 1,31 Gy/min

Für die externe Bestrahlung bei 4°C von FRTL5 ergab sich eine lineare Dosisabhängigkeit zwischen Dosis und DNA-Schaden (OTM) von $y = 0,42x$ (Abb.5). Eine Erhöhung der Dosis führte zum Anstieg des OTM.

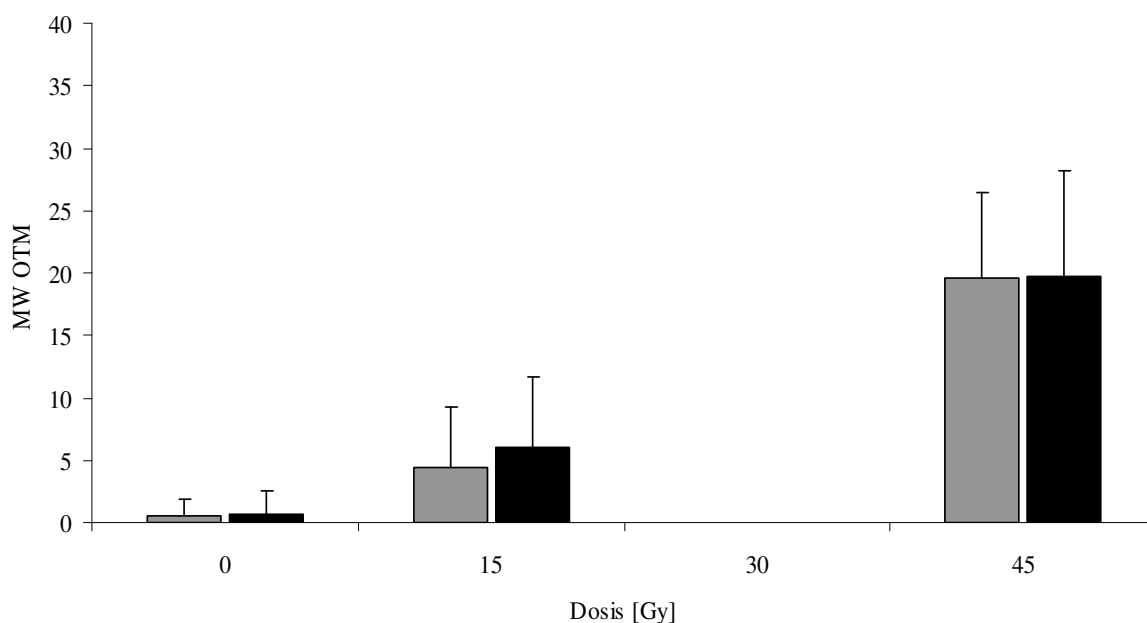


Abb.6 DNA-Schaden bei unterschiedlichen Bestrahlungszeiten mit verändertem Röhrenstrom, externe Bestrahlung bei 4°C, grau 11:26 min/34:13 min, schwarz je 1 h bei 15 Gy und 45 Gy

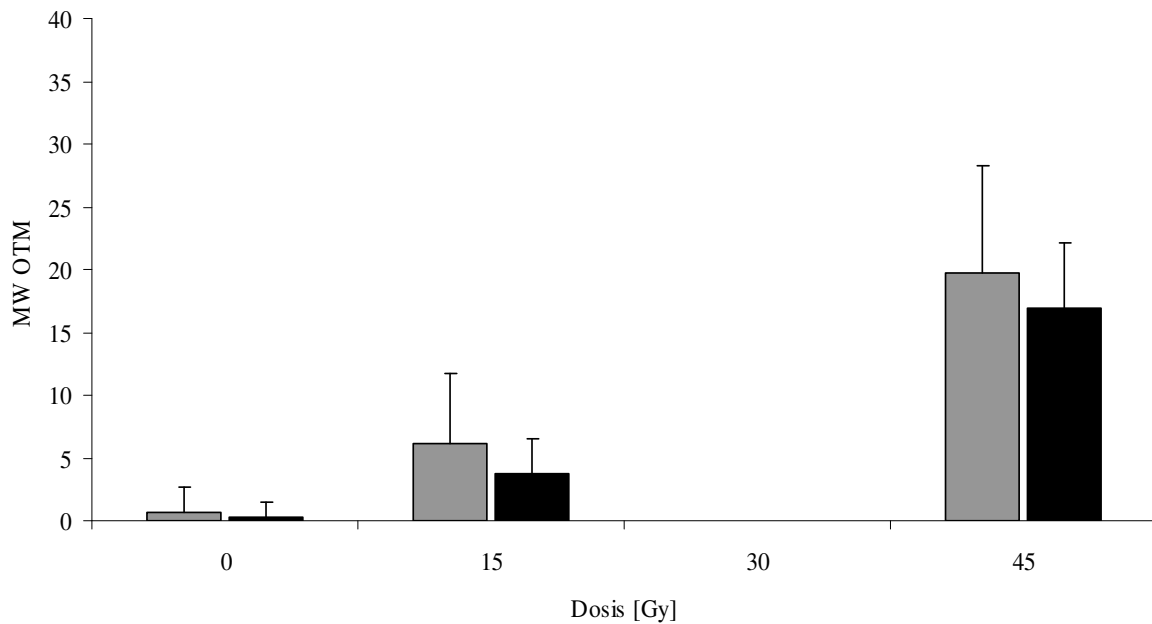


Abb.7 Einfluss der Temperatur auf den Strahlenschaden bei externer Bestrahlung über 1 h von FRTL5 bei 4°C (grau) und 37°C (schwarz)

Zum Ausschluss des Einflusses der Bestrahlungsdauer und der Höhe des Röhrenstroms auf den entstehenden Strahlenschaden, wurden die Zellen über eine Stunde mit verminderter Stromstärke durch die Röntgenröhre bei 4°C bestrahlt. In Abb.6 wurden die Werte für 15 Gy und 45 Gy für die unterschiedlichen Bestrahlungszeiten dargestellt. Es war nicht entscheidend, ob die Bestrahlungszeit für 45 Gy eine Stunde oder 34:13 min betrug, die OTM ergaben einen MW von rund 20. Sie unterschieden sich nicht signifikant.

Um den Einfluss der Temperatur bewerten zu können, wurden FRTL5 bei 4°C und 37°C über 1 h bestrahlt. Aus Abbildung 7 wird deutlich, dass die bei 37°C bestrahlten Zellen ein signifikant niedrigeres OTM als die bei 4°C bestrahlten FRTL5 aufweisen.

3.2.1.2. Einfluss des Ablösezeitpunktes auf die Dosis-Wirkung

Da sich nach der Bestrahlung lange Wartezeiten aufgrund der schlechten Ablösbarkeit von FRTL5 ergaben, wurden die Zellen versuchsweise in Suspension bestrahlt. Abb.8 zeigt den Einflussung des Ablösezeitpunktes auf die Dosis-Wirkung nach Bestrahlung.

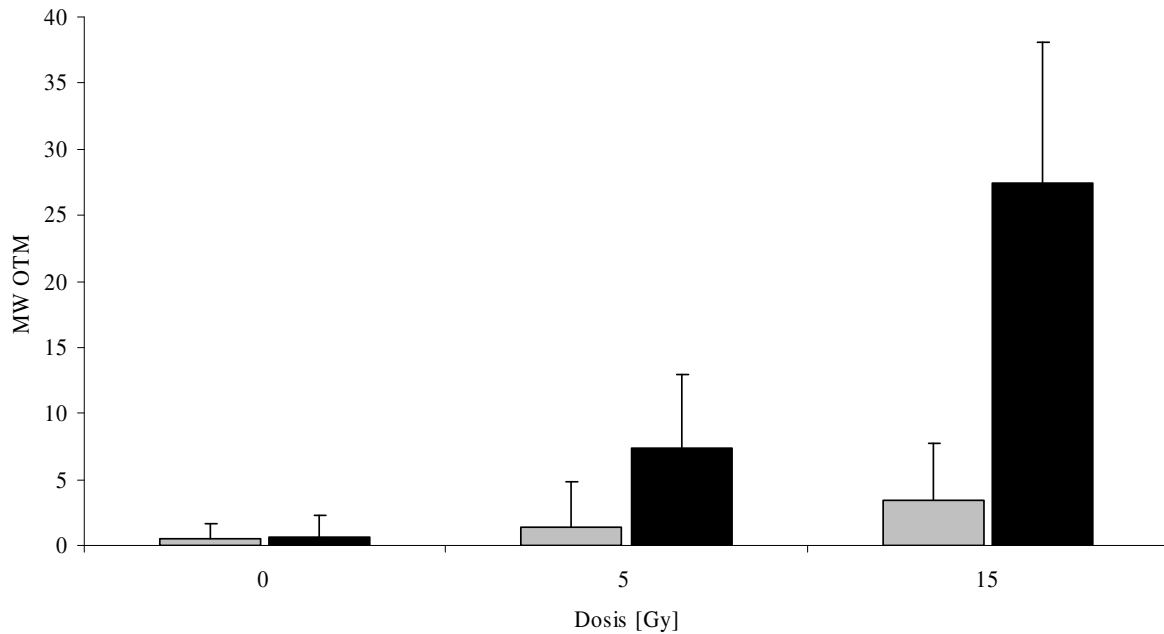


Abb.8 Adhaerent (grau) und nicht adhaerent (schwarz) bestrahlte FRTL5

Die Zellen wurden vor bzw. nach der Bestrahlung mit Accutase abgelöst. Die Werte von den mit 5 und 15 Gy bestrahlten, nicht adhaerenten Zellen liegen signifikant über den OTM-Werten adhaerenter Zellen.

3.2.1.3. Der Effekt von Methimazol, Nicotinamid und Perchlorat bei externer Bestrahlung auf FRTL5, 4°C

In Abb.9 wurde der Einfluss von Methimazol, Nicotinamid und Perchlorat auf die FRTL5-Zelllinie durch das OTM dargestellt. Um den Einfluss der Mediatoren auf die DNA-Schädigung durch externe Röntgenstrahlung unbeeinflusst untersuchen zu können, wurden die Experimente unter Ausschaltung der Reparaturmechanismen bei 4°C durchgeführt.

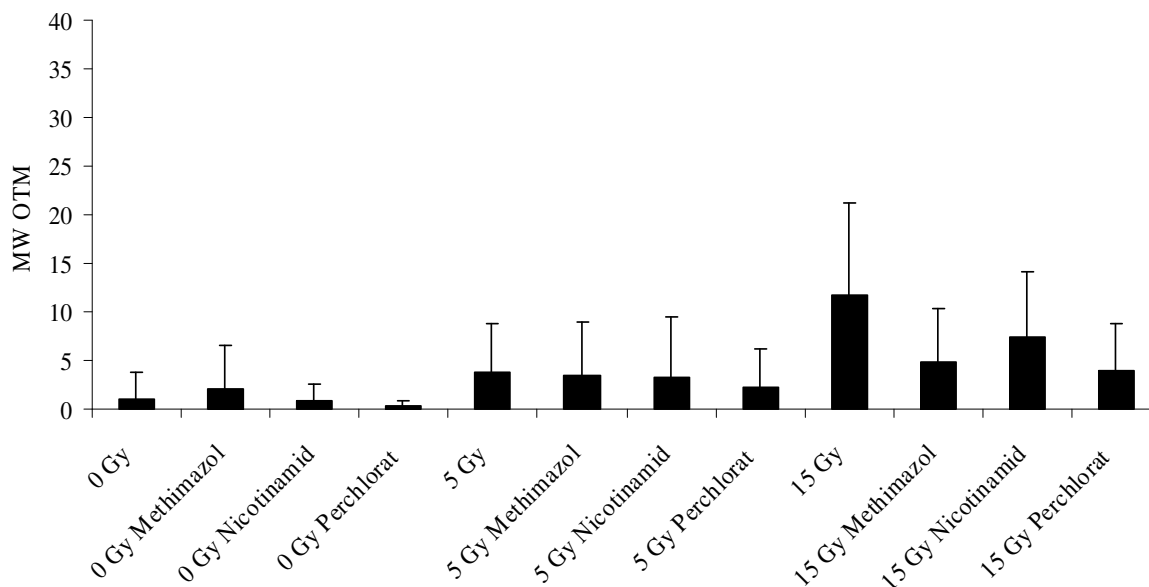


Abb.9 Modulation der Radiosensitivität bei externer Röntgenbestrahlung von FRTL5

Mit externer Bestrahlung der Schilddrüsenzellen konnte der dosisabhängige Anstieg des OTM gezeigt werden. Höhere Energiedosen bewirkten ein höheres OTM. Der strahlenmodulierende Effekt der Mediatoren Methimazol und Perchlorat war bei 5 Gy tendenziell ($p < 0,05$ für 5 Gy Kontrolle vs. 5 Gy Perchlorat), bei 15 Gy jedoch deutlich erkennbar. Die Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe bei einer Dosis von 15 Gy waren signifikant (t-Test, $p < 0,05$) Nicotinamid zeigte keinen sensibilisierenden Effekt auf die FRTL5-Kulturen.

3.2.1.4. Die Wirkung von Methimazol auf FRTL5 unter externer Bestrahlung bei 4°C/37°C

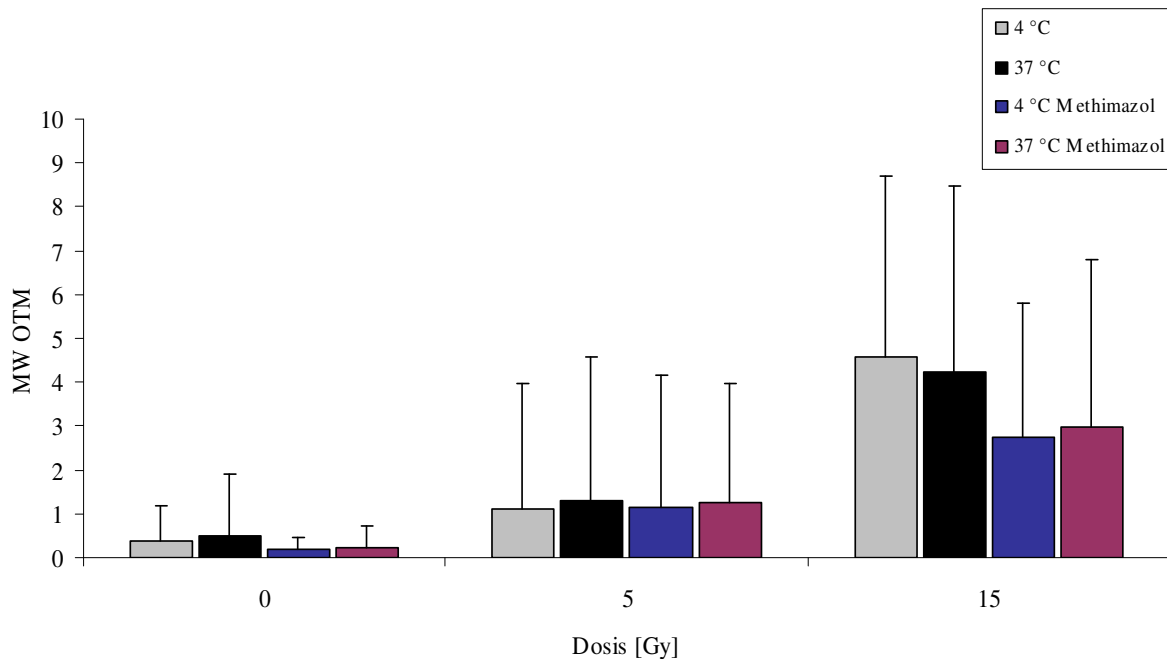


Abb.10 OTM-Werte für 4°C (grau) und 37°C (schwarz) mit und ohne Methimazol (blau 4°C, rot 37°C) nach externer Bestrahlung

Bei dieser Versuchsreihe sollten eventuelle Unterschiede in der Wirksamkeit des Methimazols hinsichtlich der Temperatur geprüft werden. Die Dosissteigerung ging mit einem Anstieg des OTM einher. Bei 5 Gy waren noch keine signifikanten Unterschiede vorhanden. Die MW der OTM bei 15 Gy jedoch zeigten eine deutliche Reduzierung des OTM durch die Zugabe von Methimazol sowohl bei 4°C als auch bei 37°C.

3.2.2. Dosis-Wirkung von Röntgenstrahlung auf PC3

3.2.2.1. Der Effekt von Methimazol, Nicotinamid und Perchlorat bei externer Bestrahlung auf PC3, 4°C

In der folgenden Abbildung wurde die Auswirkung der Mediatoren auf die Strahlenschädigung von PC3 dargestellt.

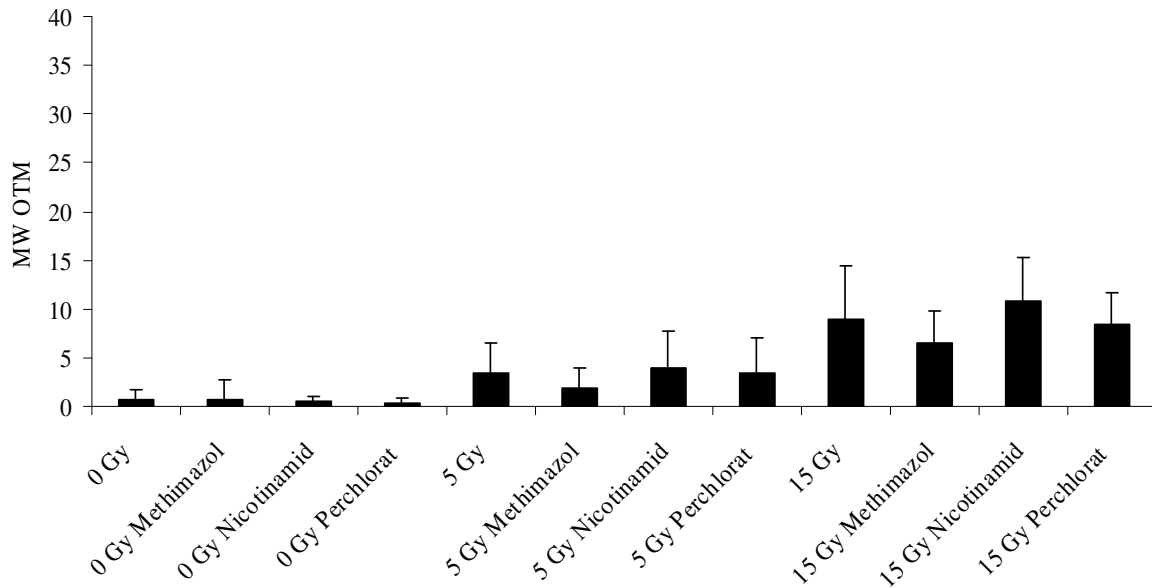


Abb.11 DNA-Schaden bei externer Röntgenbestrahlung und Mediatorzugabe bei PC3, 4°C

Die Prostatakarzinomzelllinie PC3 zeigte mit steigender Dosis eine Erhöhung des OTM. Ein Vergleich mit den OTM-Kontrollwerten der extern bestrahlten FRTL5-Zelllinie zeigte, dass bei einer Dosis von 5 Gy keine Signifikanz ($p=0,16$) hinsichtlich des Strahlenschadens bestand. Nach einer applizierten Dosis von 15 Gy wies die PC3-Zelllinie einen signifikant niedrigeren Strahlenschaden als FRTL5 auf ($p < 0,05$).

Methimazol wirkte strahlenprotektiv, sowohl der 5 Gy als auch der 15 Gy-Wert waren erniedrigt ($p < 0,05$). Die Ergebnisse von Nicotinamid und Perchlorat waren bei 5 Gy hinsichtlich einer strahlenmodulierenden Wirkung nicht aussagekräftig. 15 Gy Perchlorat unterschied sich nicht signifikant von der Kontrolle, 15 Gy Nicotinamid war gegenüber dem Kontrollwert signifikant erhöht.

3.3. ¹⁸⁸Re-Bestrahlung von FRTL5 und PC3

Bei der Bestrahlung mit ¹⁸⁸Re erfolgte die Vorbereitung, Aufarbeitung und Analyse der Proben wie unter 3.2. beschrieben. Der Unterschied bestand in der Art der Bestrahlung. 100 µl Radionuklidlösung, mit einer Aktivität von 100 bzw. 300 MBq, wurden direkt in die Kavitäten der 6-W-MTP gegeben. Die Inkubationszeit bei 4°C/37°C betrug 1 h.

3.3.1. Wirkung der ^{188}Re -Bestrahlung auf FRTL5

FRTL5 besitzen den NIS, welcher energieabhängig ist. Daher wurden sie unter 4°C- und 37°C-Bedingungen mit ^{188}Re bestrahlt.

3.3.1.1. Auswirkung von Methimazol, Nicotinamid und Perchlorat auf FRTL5 unter Bestrahlung bei 4°C

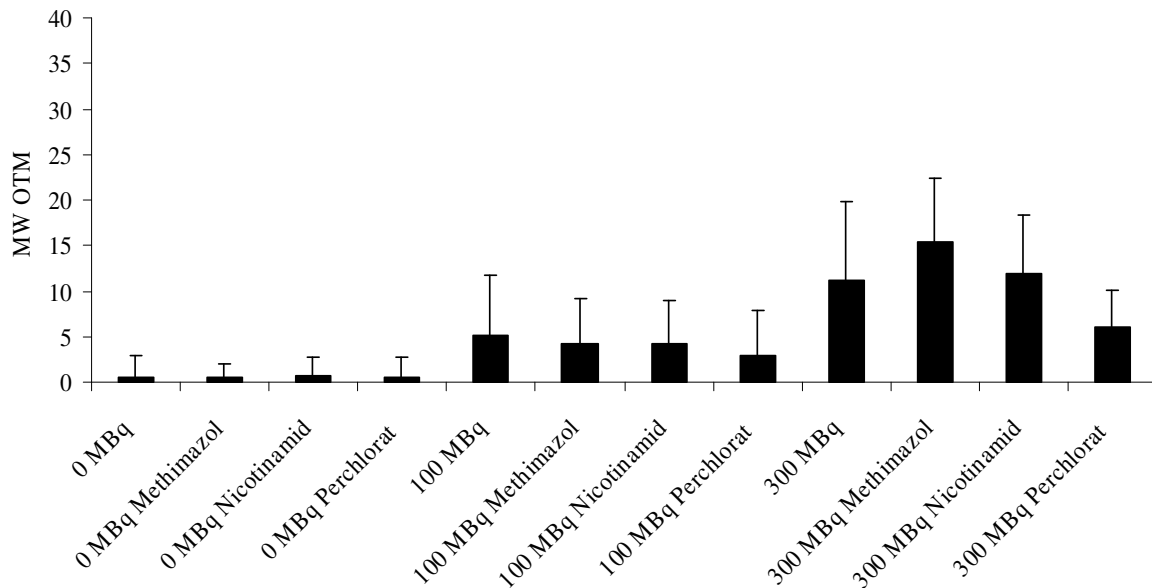


Abb.12 Modulation des OTM bei ^{188}Re -Bestrahlung von FRTL5

Mit Erhöhung der zugefügten Aktivität pro Well war ein Anstieg des OTM erkennbar. Bei einer Aktivität von 300 MBq ^{188}Re war der OTM-Wert der Kontrolle signifikant gegenüber der 100 MBq-Kontrolle erhöht ($p < 0,05$). Perchlorat zeigte eine Protektion der FRTL5 bei der Bestrahlung mit Rhenium unter 4°C Bedingungen. Sowohl bei 100 MBq als auch 300 MBq waren die OTM der Perchloratproben signifikant niedriger als die jeweiligen Kontrollwerte. Methimazol hingegen hatte keinen Effekt. Für Nicotinamid ließ sich ebenfalls keine Sensibilisierung feststellen.

3.3.1.2. Beeinflussung des Strahlenschadens durch Methimazol und Perchlorat unter ^{188}Re -Bestrahlung bei 4°C/37°C

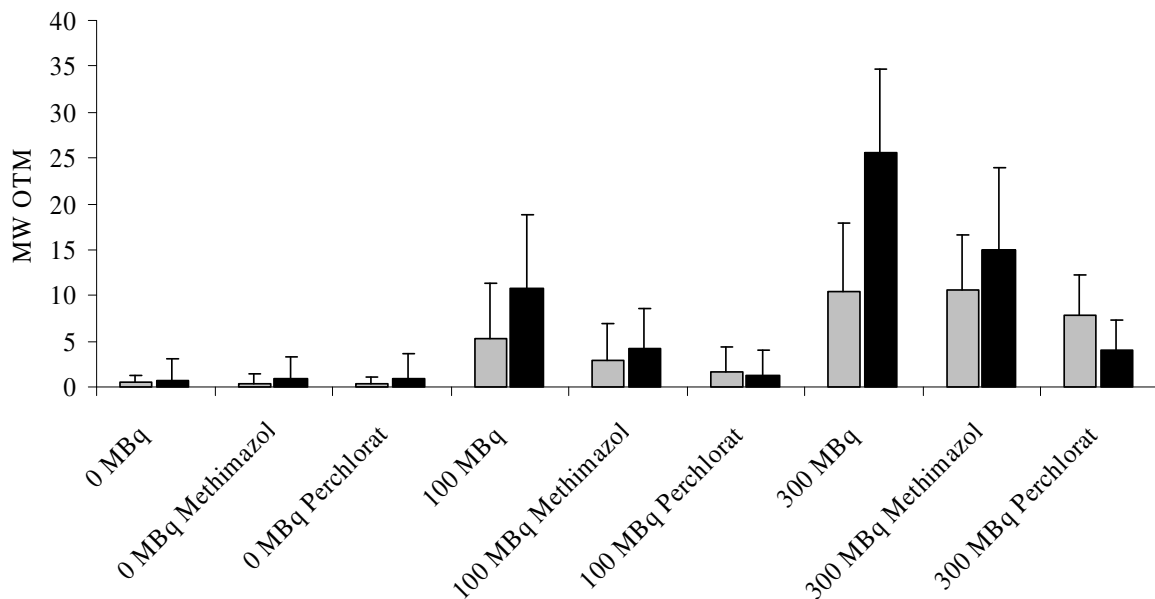


Abb.13 Modulation des DNA-Schadens unter ^{188}Re -Bestrahlung von FRTL5 bei 4°C (grau) und 37°C (schwarz)

Die Abb.13 zeigt deutlich den Unterschied des Strahlenschadens zwischen der 4°C- (grau) und der 37°C-Probe (schwarz).

Die bei 37°C bestrahlten Kontrollen wiesen ein höheres OTM als die 4°C Kontrollen auf. Die strahlenprotektive Wirkung von Methimazol und Perchlorat war sowohl bei 100 MBq als auch bei 300 MBq zu erkennen. Die Signifikanzprüfung ergab $p < 0,05$ für beide Mediatoren verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

Bei den 4°C-Proben war die protektive Wirkung des Perchlorats erneut erkennbar (vergleiche Abb.12), Methimazol hingegen verhielt sich nicht eindeutig. Bei 100 MBq war eine deutliche Protektion zu sehen, bei 300 MBq kein signifikanter Effekt erkennbar.

3.3.2. Wirkung der ^{188}Re -Bestrahlung auf PC3

Im Folgendem wurden die Ergebnisse für die Bestrahlung der Prostatakarzinomzellen mit ^{188}Re dargestellt. Die Experimente wurden ausschließlich bei 4°C durchgeführt, da PC3 NIS-negativ sind und kein energieabhängiger Transport zu erwarten war.

3.3.2.1. Einfluss von Methimazol, Nicotinamid und Perchlorat bei 4°C unter Bestrahlung mit ^{188}Re auf PC3

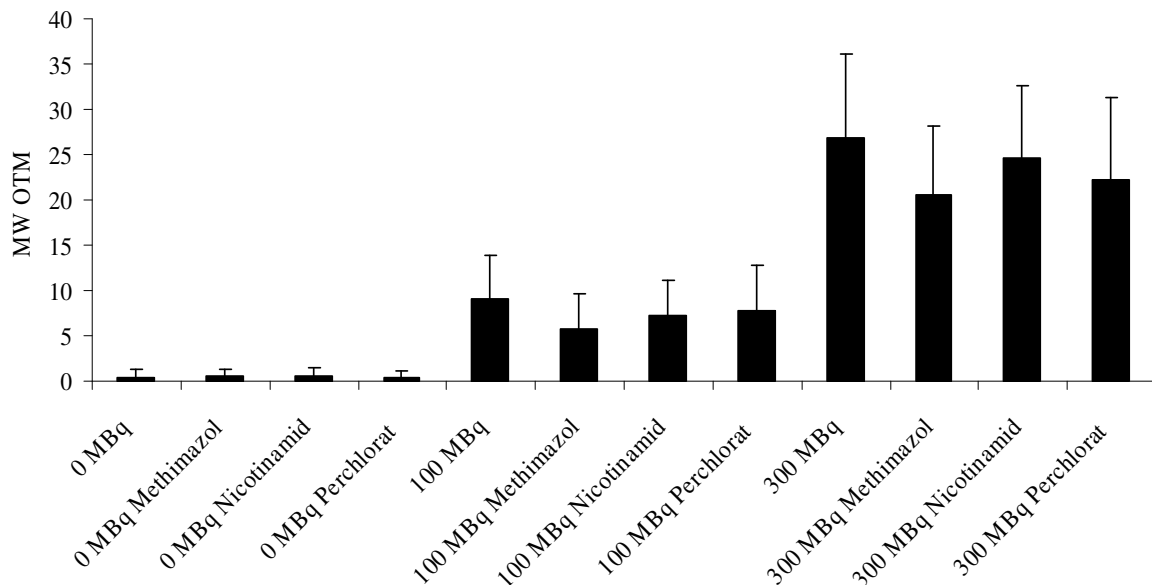


Abb.14 Bestrahlung von PC3 mit ^{188}Re unter Zugabe von Methimazol, Nicotinamid und Perchlorat, 4°C

Die Erhöhung der Aktivität pro Well bewirkte einen Anstieg des OTM. Methimazol sowie Perchlorat erniedrigten den Strahlenschaden signifikant bei 100 MBq und 300 MBq. Die Effektivität des Perchlorats war aber im Vergleich mit der Wirkung bei FRTL5 niedriger.

Insgesamt erreicht die PC3-Zelllinie höhere Strahlenschäden bei der Bestrahlung mit ^{188}Re als FRTL5.

3.4. Uptake von ^{188}Re -Perrhenat in FRTL5 bei 4°C und 37°C

Um eine Aussage zur intrazellulären Aktivitätsmenge treffen zu können, wurde der prozentuale Uptake von ^{188}Re in die Schilddrüsenzelle bestimmt. $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{131}I und ^{211}At sind ebenfalls in ihrem Uptakeverhalten untersucht worden, die Ergebnisse finden sich im Anhang.

Tab.2 Prozentualer ^{188}Re -Perrhenatgehalt der Zellen bezogen auf die Ausgangsaktivität mit Zusatz von Methimazol und Perchlorat bei 4°C/37°C

Probenart	cpm	%	cpm	%	cpm	%	MW %
Ausgangsaktivität	856694		735909		576058		
Zellpellett 4°C	29751	3,47	5633	0,77	9117	1,58	1,94
Zellpellett 37°C	84114	9,82	58105	7,90	60588	10,52	9,41
Zellpellett 4°C Methimazol	14518	1,69	2433	0,33	5616	0,97	1,00
Zellpellett 37°C Methimazol	55979	6,53	49391	6,71	24786	4,30	5,85
Zellpellett 4°C Perchlorat	513	0,06	524	0,07	322	0,06	0,06
Zellpellett 37°C Perchlorat	589	0,07	988	0,13	322	0,06	0,09

Der obigen Tabelle ist zu entnehmen, dass der Uptake des Radionuklides bei 4°C deutlich unter den 37°C-Werten lag. Der maximale Aufnahmewert von ^{188}Re in die Schilddrüsenzelle betrug 9,4 %. Methimazol reduziert den Uptake bei 37°C um ca. ein Drittel, Perchlorat verhindert den Uptake nahezu vollständig.

Unter 4°C-Bedingungen vermindern sowohl Methimazol als auch Perchlorat die aufgenommene Aktivität verglichen mit der 4°C-Kontrolle. Methimazol von 1,94 auf 1,0 %, Perchlorat von 1,94 auf 0,06 %.

3.5. Uptakeausschluss in PC3

Um die Aufnahme von Perrhenat in PC3 beurteilen zu können, wurden ebenfalls Uptakeversuche bei 4°C und 37°C durchgeführt. Es zeigte sich keine zelluläre Traceraufnahme.

4. Diskussion

Anliegen der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Strahlenqualität, biologischem Testsystem, Temperatur und Modulatoren auf den mit dem Comet-Assay bestimmbaren DNA-Schaden zu untersuchen. Im nun folgenden Abschnitt dieser Arbeit soll die Frage nach der Wirksamkeit von Methimazol, Nicotinamid und Perchlorat an den verwendeten Zelllinien FRTL5 und PC3 geprüft werden. Es wird zuerst auf die Validität des Comet Assays eingegangen. Daran schließen sich Betrachtungen zur Dosis-Wirkungsbeziehung bei externer Bestrahlung an.

Die Aufnahme des ^{188}Re und die Beeinflussung der Nuklidaufnahme in die Zelle durch die Interaktion am NIS wird in Kapitel 4.2. diskutiert, anschließend der Einfluss der ausgewählten Mediatoren auf FRTL5 und PC3 unter Bestrahlung erörtert. Zuletzt soll auf limitierende Einflüsse des verwendeten Comet Assayprotokolls und der Versuchsbedingungen eingegangen werden.

4.1. Dosis-Wirkungsbeziehung bei der Verwendung des Comet Assays

4.1.1. Standardisierungsmöglichkeit der Auswertung des Comet Assays

Bei der Bestrahlung von Zellen kommt es zu DNA-Schäden. Der Comet Assay stellt eine Methode geringen Aufwands und schnellen Ergebnisgewinns zur Quantifizierung von DNA-Schädigung dar und ist an nahezu allen eukaryotischen Zellen anwendbar [21]. Doch ist der Comet Assay nur eine Methode zum Nachweis von DNA-Schäden, des Weiteren können der Mikronukleusassay, die Pulsfeldgelelektrophorese, Filterelution, TUNEL oder H2AX zum Nachweis der Schädigung der DNA und deren Ausmaß genutzt werden [71].

In unserer Arbeit wurde das Olive Tail Moment als Maß für die Schädigung gewählt. Das OTM an sich ist ein gutes Korrelat für die Dosis-Wirkungsbeziehung beim Comet Assay. Kumaravel et al. [41] haben die Parameter der Komet 5.0 Software auf Aussagefähigkeit und Übereinstimmung hinsichtlich steigender Strahlendosen geprüft und für das OTM, %-Tail DNA (relative Fluoreszenzintensität von Kopf und Schwanz [14]) und das tail extent moment (Produkt aus Schwanzlänge und %-Tail DNA) die beste Korrelation für die Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung gezeigt.

Um den Fehlerbereich der hier vorgelegten Daten zu testen, wurden 10-fach Bestimmungen des OTMs für 0, 5 und 15 Gy an FRTL5 durchgeführt. Je Dosis wurden aus einer Probe 10

Objektträger beschichtet und diese anschließend durch 2 Auswerter (A1, A2) unabhängig voneinander analysiert. Böcker et al. beschäftigten sich 1997 mit der Bildanalyse des Comet Assays [7]. Es wurden Lymphozyten bei 37°C mit der Röntgenröhre bestrahlt. Unter anderem wurde dieselbe Probe durch 3 Auswerter unabhängig voneinander analysiert. Hierbei kamen sie zu dem Resultat, dass die Ergebnisse, trotz fehlender statistischer Auswertung der Daten und Unterschiede im DNA Schaden von bis zu 3 Skaleneinheiten, auswerterunabhängig sind und die Methode Comet Assay eine hohe Reproduzierbarkeit aufweist.

In unserer Arbeit wurden der Mittelwert (MW) des OTM, die einfache Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient ($VK=SD/MW$) zum Vergleich der 2 Auswerter herangezogen. Die Unterschiede zwischen den MW der OTM der je 10 Objektträger zwischen den 2 Auswertern waren nicht größer, als die Schwankungsbreite des OTM innerhalb der 10 ausgewerteten Objektträger jedes einzelnen Untersuchers. Trägt man alle Messwerte beider Auswerter in einem Diagramm gegeneinander auf, ergibt sich eine Gerade ($y= 1,14x$) mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2= 0,95$. Zudem weichen die Variationskoeffizienten nicht stark voneinander ab (VK 5 Gy: A1 0,19; A2 0,13; VK 15 Gy: A1 0,15; A2 0,11). Trotz des linearen Zusammenhanges zeigte sich bei dem Vergleich der Mittelwerte beider Auswerter für 15 Gy ein signifikanter Unterschied im t-Test ($p < 0,05$). Für 0 und 5 Gy war kein signifikanter Unterschied nachweisbar. Die Signifikanz zwischen den 15 Gy MW könnte durch eine zunehmende Streuung der OTM erklärbar sein, da bei zunehmender Dosis größere OTM-Schwankungen vorhanden sind. Bei Betrachtung der einzelnen Werte jedes Auswerter fiel auf, dass A1 stets niedrigere OTM bei 15 Gy bestimmt hatte als A2. Somit unterliegt die Auswertung der Kometen auch der Subjektivität des Betrachters; die Auswertung einer Versuchsreihe sollte somit ausschließlich von einem Untersucher durchgeführt werden.

4.1.2. Dosis-Wirkungskurve bei externer Bestrahlung

Um die Strahlenempfindlichkeit und den Bereich der tolerablen Bestrahlung der FRTL5-Zellen einschätzen zu können, wurden Dosis-Wirkungskurven für 4°C und 37°C erstellt. Es wurde bis 45 Gy bestrahlt und der DNA-Schaden mittels Comet Assay ausgewertet. Die 4°C-Kurve (Abb. 5) zeigte eine lineare Abhängigkeit des OTM von der Bestrahlungsdosis ($y = 0,42x$). Allerdings sind die gemessenen Werte nicht repräsentativ für die Initialschäden der Zelle, da während der langen Verarbeitungszeit (ca. 40 min wurden zum Ablösen der Zellen aus den Wells benötigt) schon Reparaturprozesse stattfanden. Somit besteht nur eine eingeschränkte Aussagefähigkeit über den Initialschaden der FRTL5. Die lineare Abhängigkeit zwischen Dosis und resultierendem OTM sollte jedoch nicht durch die ablaufenden Reparaturprozesse beeinträchtigt worden sein.

Mehrere Arbeitsgruppen konnten unabhängig von der Zellart ebenfalls eine lineare Dosisabhängigkeit der Zellschädigung, gemessen mit verschiedenen Parametern des Comet Assays, von der Bestrahlung durch Röntgenstrahlung nachweisen [33, 44, 49, 53].

Pitozzi et al. zeigten in ihrer Arbeit über die Kalibrierung des Comet Assays [53], dass unabhängig von der verwendeten Dosisleistung (x-ray mit 2,0 Gy/min und 1,1 Gy/min, γ -ray mit 0,2 Gy/min) eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung besteht (es wurden Lymphozyten und die murine Tumorzelllinie F10-M3 verwendet, die Bestrahlung erfolgte bei 4°C, Auswertekriterium war %-Tail DNA).

Moller et al. verwiesen ihrerseits in einem Review über den alkalischen Comet Assay auf die in vielen Arbeiten anderer Autoren festgestellte lineare Dosis-Wirkungsbeziehung [44], exemplarisch stellten sie die Abhängigkeit in Form der %-Tail DNA auf einer arbiträren X-Achse dar.

Olive et al. [49] bestrahlten Chinesische Hamster V79-171b Zellen und SCCVII (Maustumorzelllinie) mit der Röntgenröhre (250 kV, Dosisleistung 7,2 Gy/min, 4°C) in Lösung. Bei der Auftragung von OTM gegen die Dosis konnten sie ebenfalls eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung zeigen.

Die unter 3.2.1.1. dargestellte Dosis-Wirkungskurve ist nur bedingt in ihren absoluten Werten mit den einzelnen Ergebnissen der anderen Versuchsreihen vergleichbar. Unterschiedliche Zellpassagen und Temperaturunterschiede bei der Elektrophorese [43, 61] beeinflussen das OTM, sodass zwar die Verhältnismäßigkeit der Ergebnisse stets wieder findbar ist, aber die absoluten Werte zwischen verschiedenen Versuchsabschnitten stark variieren können.

FRTL5 wurden in einer weiteren Versuchsreihe analog zur Bestrahlungszeit von ^{188}Re eine Stunde bei 4°C und 37°C mit der Röntgenröhre bestrahlt, um den Temperatureinfluss beurteilen

(Abb.7) und die Dauer der Bestrahlung als Einflussfaktor ausschließen zu können (Abb.6). Für die Dosen 15 und 45 Gy wurde der Röhrenstrom bei Bestrahlung über eine Stunde entsprechend reduziert. Vergleicht man die Ergebnisse von 15/45 Gy 4°C miteinander, ergibt sich für 45 Gy kein signifikanter Unterschied zwischen den OTM-Werten. Die 15 Gy-Werte sind zwar signifikant unterschiedlich, doch weicht der 15 Gy-Wert mit OTM 4,43 als einziger von der Regressionsgeraden nach unten ab (Abb.5). Die Annahme eines Wertes auf Niveau der Regressionsgeraden ist wahrscheinlicher. Somit sollte die Dauer der Bestrahlung keinen Einfluss auf das OTM haben.

Die bei 37°C bestrahlten FRTL5 zeigen ein niedrigeres OTM. Dies begründet sich aus der Möglichkeit zur Reparatur im Gegensatz zu den bei 4°C bestrahlten Zellen.

Für die PC3 wurde aufgrund der oben zitierten Arbeiten ebenfalls eine lineare Abhängigkeit der Dosis-Wirkungsbeziehung angenommen. Beim Auftragen der OTM bis 15 Gy ergab sich bei externer Bestrahlung (4°C) eine Gerade mit $y = 3,99x - 3,59$.

4.1.3. Bestrahlung mit ^{188}Re und der Vergleich mit Röntgenbestrahlung

Im Unterschied zu den dosisabhängigen unterschiedlich langen Bestrahlungszeiten bei der externen Bestrahlung durch die Röntgenröhre, betrug die Bestrahlungszeit bei ^{188}Re immer 1 h. Die Änderung der Radioaktivitätsmenge führte hier zu unterschiedlichen Dosen (100 MBq entsprachen 27,5 Gy, 300 MBq entsprachen 82,5 Gy). Die im Folgenden diskutierten Experimente wurden ausschließlich bei 4°C durchgeführt, sodass die Reparatur vernachlässigbar ist und somit auch der Zeitfaktor der Bestrahlung (wie unter 4.1.2. beschrieben).

Röntgen- und β -Strahlung unterscheiden sich in ihrem Energiegehalt. In unserer Arbeit wurden FRTL5 und PC3 als adhaerente Zellkulturen bestrahlt. Vergleicht man den entstandenen Strahlenschaden durch ^{188}Re und externe Röntgenbestrahlung in Form des OTM bei FRTL5, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Strahlungsarten (siehe Abb. 9/12, Röntgen OTM 5 Gy 3,76; 15 Gy 11,73; ^{188}Re OTM 100 MBq 5,14; 300 MBq 11,28). Wie unter 4.2.1. näher dargestellt, war die Dosis durch die Perrhenatbestrahlung höher berechnet worden als die durch die Röntgenröhre applizierten 15 Gy. Warum ist der Strahlenschaden für 15 Gy Röntgenbestrahlung und 300 MBq ^{188}Re -Perrhenat dann aber identisch?

In der Literatur sind bisher keine quantitativen Vergleiche zwischen Röntgen- und β -Strahlern in vitro in Bezug auf den Comet Assay beschrieben worden. Eine Arbeit von Gomolka et al. beschäftigte sich mit dem Vergleich von Röntgen- und γ -Strahlung an Lymphozyten mit Hilfe

des alkalischen Comet Assays [30]. Bei Raumtemperatur wurden Lymphozyten mit 29 kV bzw. 200 kV Röntgenstrahlung, ^{60}Co - und ^{137}Cs - γ -Strahlung in einem Dosisbereich von 0 bis 3 Gy bestrahlt. Die Initialschäden der Zellen waren für alle 4 Bestrahlungsmodalitäten nicht signifikant unterschiedlich. Gomolka begründete die nicht bestehenden Unterschiede mit einer Limitation der Methode. Mit dem alkalischen Comet Assay lassen sich Doppelstranbrüche (DSBs) nicht von SSBs unterscheiden. DSBs stellen lediglich 2 % der DNA-Schäden dar, werden jedoch schlechter repariert als SSBs. Somit wäre die Darstellung des Initialschadens als OTM kein guter Parameter für die Erfassung unterschiedlicher radiobiologischer Wirksamkeit (RBW). Die Darstellung von Punktmutationen schien Gomolka eine bessere Möglichkeit zur Erfassung der unterschiedlich schädigenden Wirkung verschiedener Strahlenqualitäten zu sein. Diese Schlussfolgerung wäre eine Erklärungsmöglichkeit für die gleiche Wirkung von Röntgen- und ^{188}Re -Bestrahlung auf FRTL5 in unserer Arbeit. Repairwerte könnten dazu beitragen, die Repaireffizienz nach Applikation unterschiedlicher Strahlenqualitäten zu zeigen. Eine höhere Anzahl DSBs sollten sich in einer langsameren oder ineffektiveren Reparatur manifestieren.

Haines et al. bestrahlten Spermatogonien (in vivo wurden Mäusetestes bestrahlt) mit Röntgen- und β -Strahlung [33]. Der Schaden wurde nach 45 Tagen mittels Comet Assay betrachtet. Da Spermatozoen laut Haines keine DNA-Reparirmechanismen aufgrund transkriptioneller Inaktivität haben, wurde der nach 45 d detektierte Schaden mit der Ausgangsschädigung gleichgesetzt. Trotz einer zweifach höheren $^{114\text{m}}\text{In}$ -Dosis (1,85 MBq intraperitoneal verabreicht entsprachen 9,9 Gy kumulativ über die gesamten 45 Tage) waren die Ergebnisse ähnlich der Röntgenbestrahlung (4 Gy im Stadium der Spermatogonie). Dies begründete Haines mit einer 5-50 fach höheren Radioresistenz der postmitotischen Keimzelle, die errechnete prämitotische Dosis lag somit bei rund 2 Gy.

Demzufolge wäre eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die nahezu gleichen OTM-Werte bei FRTL5, dass es sich bei ihr um eine Zellart handelt, welche eine große Toleranz gegenüber einer Erhöhung der Strahlendosis hätte. Es ließen sich in der Literatur keine Angaben zur Bestrahlung und Sensibilität von FRTL5 finden. Lediglich eine Arbeit von Francesconi et al. [24] beschäftigte sich mit der UV-C-Bestrahlung der Schilddrüsenzelllinie (dem Artikel konnten keine Temperaturangaben zum Zeitpunkt der Bestrahlung entnommen werden). Sie konnten mit der Methode des Comet Assays eine gute Strahlensensibilität hinsichtlich UV-C (254 nm) feststellen. Inwiefern diese Beobachtung auf eine Photonen- bzw. Betabestrahlung übertragbar ist, bleibt offen.

Bei PC3 war eine Verdreifachung des Strahlenschadens der PC3-Zelllinie bei ^{188}Re im Gegensatz zur Röntgenbestrahlung zu sehen. Prostatakarzinomgewebe ist als strahlensensibel

einzuordnen [18, 72]. Eine mögliche Erklärung für die Reaktion auf die verschiedenen Strahlungsarten wäre, dass PC3 eine unterschiedliche intrinsische Strahlensensitivität für Röntgen- und β -Strahlung aufweist. Somit könnte auch eine geringgradig höhere β -Aktivität schon zu einem wesentlich höheren OTM führen. Ein weiterer DNA-Test, wie z.B. H2AX oder der Mikronukleusassay, könnte zu einer Verifizierung oder Widerlegung der stärkeren Wirksamkeit ^{188}Re gegenüber Röntgenstrahlung dienen.

Friesen et al. beschäftigten sich mit dem Einfluss von β - und γ -Bestrahlung auf die Apoptosemechanismen an Leukämiezelllinien [28]. CEM (humane lymphoblastische Leukämiezelllinie, T-Zelltyp) und HL-60 (humane myeloische Leukämiezelllinie) wurden mit ^{188}Re und γ -Strahlung in Zellkulturflaschen mit Dosen von 1 bis 10 Gy bei 37°C bestrahlt. Nicht nur die Dosis war ausschlaggebend für die Induktion der Apoptose, sondern auch die Strahlenqualität. γ -Strahlung bewirkte eine höhere Apoptoserate und eine frühere Initiation der Apoptose als β -Strahlung. Die ausgelösten Apoptosewege beider Strahlenqualitäten waren jedoch gleich. In einer weiterführenden Arbeit von Friesen et al. konnte unter Verwendung von α - und β -Strahlern sogar ein Einfluss der Strahlenqualität auf die Auslösung unterschiedlicher Apoptosewege gezeigt werden [27]. Die Unterschiede von Ausmaß und Auslösezeitpunkt der Apoptose könnten auf die Abhängigkeit des Strahlenschadens von der Strahlenqualität hinweisen. Die in unserer Arbeit beschriebenen Unterschiede im OTM von PC3 zwischen ^{188}Re und Röntgen-Bestrahlung würden die Vermutung unterschiedlicher biologischer Wirksamkeit bzw. unterschiedlicher intrinsischer Strahlensensibilität durch verschiedene Strahlenqualitäten bestätigen.

Hengstler et al. verglichen den Einfluss von ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ und ^{137}Cs auf humane, mononukleäre Zellen des Blutes [34]. Der DNA-Schaden wurde durch das OTM mit dem Comet Assay bestimmt. In einem Dosisbereich von 0 bis 370 MBq/ml wurden bei 4°C unter ^{131}I -Bestrahlung 81 SSB pro Zelle/h erreicht, bei vergleichbarer Aktivität unter $^{99\text{m}}\text{Tc}$ nur 7 SSB pro Zelle/h. Verglichen mit der ^{137}Cs -Quelle (DL 5 Gy/min) verursachte 1 MBq ^{131}I /ml/h die gleiche Anzahl an SSB wie 15 cGy ^{137}Cs , die Anzahl der SSB von 1 MBq $^{99\text{m}}\text{Tc}$ /ml/h entsprachen 1,3 cGy. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ist ein γ -Strahler, welcher annähernd vergleichbar mit Röntgenstrahlung ist, ^{188}Re ein β -Strahler wie auch ^{131}I . In unserer Arbeit wurden unter Röntgenbestrahlung von PC3 ebenfalls signifikant niedrigere OTM-Werte gemessen als unter β -Bestrahlung, bei FRTL5 war kein Unterschied erkennbar. Auch hier lässt sich vermuten, dass unterschiedliche Strahlenqualitäten auf verschiedene Zelllinien unterschiedliche Auswirkungen haben. Dies könnte durch unterschiedliche relative biologische Wirksamkeit oder unterschiedlich Strahlensensibilität der Zelllinien begründet werden.

4.2. Uptake von FRTL5 und Beeinflussung der ^{188}Re -Perrhenataufnahme

Um die tatsächliche Dosis nach interner Bestrahlung von ^{188}Re in der Rattenschilddrüsenzelle FRTL5 beurteilen zu können, wurden Uptakeversuche bei 4°C und 37°C, sowie mit und ohne Zusatz von Methimazol und Perchlorat durchgeführt.

Bei 37°C war eine deutliche intrazelluläre ^{188}Re -Perrhenat-Aufnahme nachweisbar. Diese betrug maximal 10 % der Gesamtaktivität. Die Radioaktivität pro Volumenelement war damit 180-fach gegenüber dem umgebenden Medium erhöht. Bei 4°C konnte noch eine eindeutige intrazelluläre ^{188}Re -Perrhenataufnahme nachgewiesen werden, welche rund 20 % der Aufnahme bei 37°C betrug. Weitere Anionen neben ^{188}Re -Perrhenat, welche durch den NIS transportiert werden, sind $^{211}\text{Astatid}$, $^{131}\text{Iodid}$ und $^{99\text{m}}\text{Pertechnetat}$, die ebenfalls im Bereich der Diagnostik und Therapie der Nuklearmedizin oder als Markierungsnuklid Anwendung finden. Ein Beispiel dafür ist die Verwendung ^{188}Re -markierter monoklonaler Antikörper vor Durchführung einer Stammzelltransplantation, wie durch Kotzerke et al. beschrieben [40].

Carlin et al. haben sich 2003 mit der in vitro Zytotoxizität von ^{211}At und ^{131}I beschäftigt [8]. Die von ihnen vorgenommenen Uptakeversuche an UVW- und NIS6-Zelllinien wurden ausschließlich bei 37°C durchgeführt. Dabei zeigte $^{211}\text{Astatid}$ eine vierfach höhere unspezifische (NIS-unabhängige) Affinität zu beiden Zelllinien als $^{131}\text{Iodid}$. Als Erklärungsmöglichkeit wurde die Annahme höherer Oxidationsstufen des $^{211}\text{Astatid}$ aufgeführt, welche unspezifische Bindungen hervorrufen können. Die Vermutung ließ sich aber in weiterführenden Untersuchungen nicht bestätigen. So könnte der höhere Astatiduptake auch mit dem Vorhandensein eines anderen, energieunabhängigen Aufnahmemechanismus erklärbar sein. Diese Vermutung kann nicht durch den Vergleich mit 4°C-Untersuchungen bestätigt werden, da von Carlin et al. nur 37°C-Versuchsdaten vorliegen.

Die hemmende Wirkung von Perchlorat auf die Anionenaufnahme ist mehrfach in der Literatur beschrieben worden und allgemein anerkannt [19, 59]. In unserer Arbeit war nach Zugabe von Perchlorat weder bei 37°C noch bei 4°C eine intrazelluläre ^{188}Re -Perrhenataufnahme an FRTL5 nachweisbar. Die gemessenen Werte entsprachen denen der PC3-Zellen, welche als Kontrolle ohne NIS dienten.

2002 führten Carlin et al. Uptakeversuche mit $^{211}\text{Astatid}$ durch, um dessen Wirksamkeit hinsichtlich einer Alternativtherapie zu $^{131}\text{Iodid}$ zu testen [9]. Eine humane Gliomzelllinie (UVW) und eine mit NIS cDNA transfizierte UVW-Zelllinie wurden verwendet. Die Versuche sind bei 4°C und 37°C durchgeführt worden, die Inkubationszeit betrug 30 min. Carlin zeigte

u.a. die Effektivität der Uptakehemmung von Perchlorat in Abhängigkeit von der Konzentration im Medium. Wie in unserer Arbeit (siehe Anhang 7.3.1.-7.3.3.) ist auch bei Carlin in der unbehandelten Probe bei 4°C ein Uptake von ^{211}At nachweisbar. Weder bei Carlin noch in unserer Arbeit ist durch Perchlorat bei 37°C eine vollständige Hemmung der Aufnahme von Astatid möglich. $^{211}\text{Astatid}$ ist ebenso wie ^{188}Re -Perrhenat und Perchlorat ein Substrat für den NIS, welcher energieabhängig ist. Bei 4°C müsste er seine Funktion eingestellt haben.

Demzufolge vermuten wir ein zweiten Aufnahmemechanismus, der energieunabhängig ist (siehe Abb.15).

Van Sande et al. [65] beschäftigten sich mit der Anionenselektivität des NIS. Sie verwendeten FRTL5- und COS-NIS6-Zellen, um die Funktion des NIS vergleichen zu können. Mit ^{186}Re -Perrhenat, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechnetat und ^{125}I -Iodid wurden beide Zelllinien bei 37°C inkubiert und die Uptakekinetik bestimmt. FRTL5 besitzt natürlicherweise als Schilddrüsenzelle NIS in ihrer Zellmembran, die COS-Zelllinie ist mit der entsprechenden humanen cDNA des NIS transfiziert worden. Die Ergebnisse zeigten für die FRTL5-Zelle bei allen 3 Radiotracern einen höheren prozentualen Uptake als für die COS-NIS6. Auch hier wurde ein weiterer, weniger spezifischer Transportmechanismus als Ursache für die Diskrepanz der Werte gemutmaßt, welcher den reinen Effekt des NIS maskiert. Auch hier fehlt ein 4°C-Vergleich. Unter Verwendung von Perchlorat konnten Van Sande et al. hingegen eine vollständige Hemmung der ^{186}Re -Perrhenat-Aufnahme in die FRTL5-Zelle nachweisen.

In unserer Arbeit wurde gezeigt, dass Perchlorat den ^{188}Re -Einstrom in die FRTL5 sowohl bei 37°C als auch bei 4°C effektiv verhinderte. Der in der 4°C-Kontrolle sichtbare Uptake war nach Zugabe von Perchlorat nicht mehr nachweisbar. Demzufolge müsste Perchlorat neben den spezifischen Effekten am NIS auch Hemmwirkung auf den anderen Aufnahmemechanismus haben, welcher energieunabhängig (4°C) ist.

Die Existenz eines zweiten Aufnahmemechanismus, zur Stützung unserer Vermutung, könnte über eine nicht-kompetitive Hemmung des NIS durch Oubain (hemmt die Na^+/K^+ ATPase [62]) untersucht werden. Der NIS ist als sekundär aktiver Symporter vom Natriumgradienten, der durch die Na^+/K^+ ATPase aufrechterhalten wird, abhängig. Ein dann noch vorhandener ^{188}Re -Perrhenat-Uptake nach Oubaingabe spräche für einen anderen Transportmechanismus. Durch Uptakeversuche mit der PC3-Zelllinie wurden passive Diffusionsvorgänge des Perrhenats bereits ausgeschlossen.

Methimazol wird in der Therapie zur Hemmung der Iodination durch die Thyreoperoxidase eingesetzt. Eine Blockade der Iodaufnahme wird damit nicht angestrebt. Die Zugabe von

Methimazol ins Medium reduzierte in unserer Arbeit die ^{188}Re -Perrhenat-Aufnahme um rund 50 % bei 37°C und um ebenfalls 50 % bei 4°C. Dieser Einfluss war unerwartet.

Die hemmende Wirkung von Methimazol ist allein durch unspezifische Membraneffekte nicht ausreichend erklärbar. Auch seine Funktion als Hydroxylradikal-Scavenger [39] ist für eine Begründung dieser Beobachtung unzulänglich. Eine Interaktion am NIS, weniger effektiv oder mit geringerer Affinität als Perchlorat, könnte für die Reduzierung des Uptakes verantwortlich sein (siehe Abb.15).

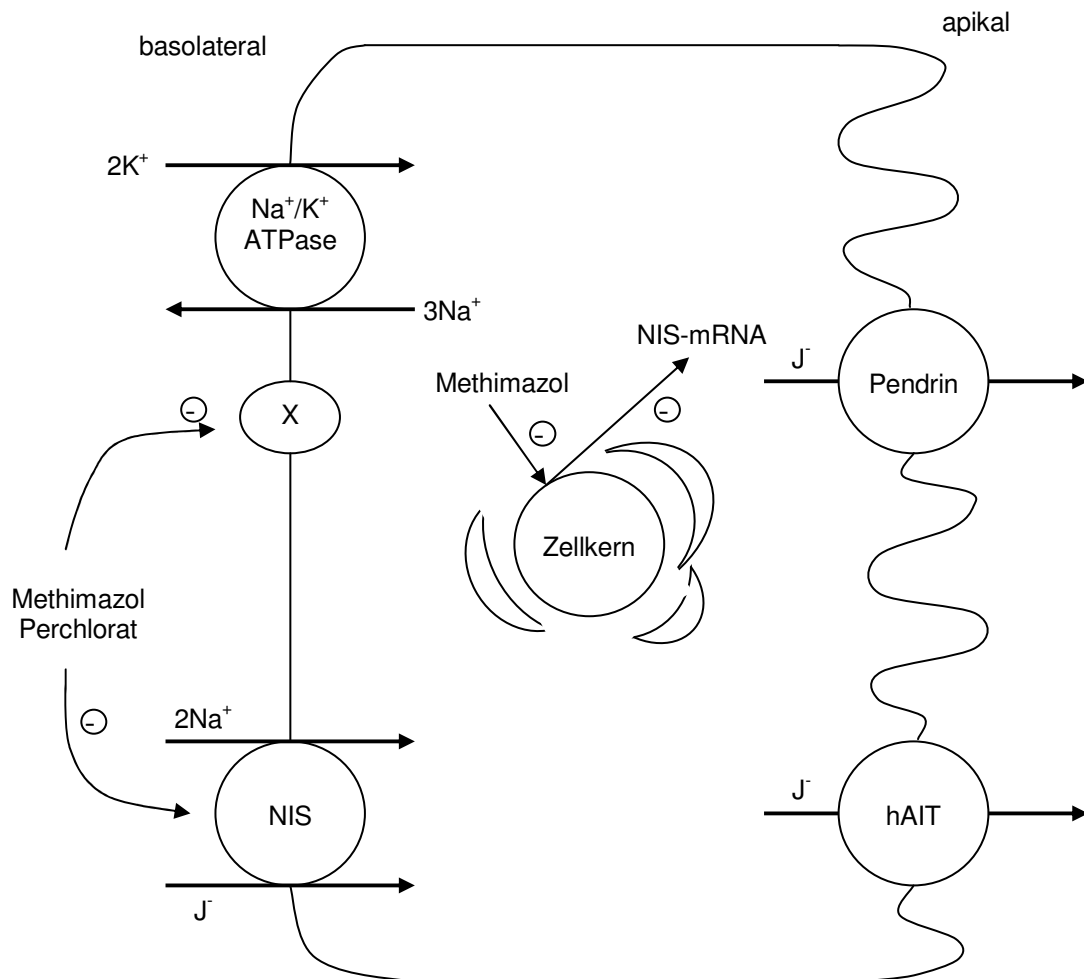
Die Datenlage hinsichtlich der Verwendung Methimazols als Uptakehemmer ist widersprüchlich. Eggo et al. [20] untersuchte den Uptake von $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ und ^{125}I iodid an FRTL5. Unter dem Einfluss von Methimazol (Inkubationszeit 6 h, 37°C, Konzentration von 0 bis 10 mM) war eine Steigerung des Pertechnetatuptakes, nicht aber des ^{125}I iodiduptakes, zu verzeichnen. Für die erhöhte Aufnahme im Gegensatz zur unbehandelten Probe wird eine intrazelluläre Reduktion von $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ zu $^{99\text{m}}\text{TcO}_2^-$ vermutet. Die Ergebnisse von Eggo et al. konnten von uns nicht nachvollzogen werden. Neben ^{188}Re -Perrhenat wurden auch ^{211}At -Astatid, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechnetat und ^{131}I -Iodid hinsichtlich ihrer Uptakekinetik getestet (siehe Anhang). Für alle 4 Nuklide konnte eine Uptakereduktion durch Methimazol bei 37°C und 4°C gezeigt werden. Extrazelluläre, membrangebundene oder Sättigungsprozesse scheinen als Erklärung wahrscheinlicher, als die von Eggo et al. angeführte Reduktion. So könnte Methimazol über eine kompetitive Hemmung am NIS die ^{188}Re -Perrhenat-Aufnahme reduzieren. Des Weiteren wäre eine Wechselwirkung am NIS möglich, die zu einer Konfigurationsänderung führen könnte.

Die Beeinflussung der NIS-RNA durch Methimazol (mit einer Konzentration von 0,1 mM) konnten Spitzweg et al. 1999 in ihrer Arbeit über Regulationsmechanismen des NIS der FRTL5-Zelllinie zeigen (Inkubationszeit 48 h, 37°C) [63]. Methimazol senkte das NIS-RNA „steady state level“, woraus sich eine Erniedrigung der Iodakkumulation um 20- 25 % ergab. Die NIS-Proteinexpressionsmenge hingegen blieb unbeeinflusst. Sie verweist ihrerseits auf eine Arbeit von Saito et al. [56]. Saito hat den Effekt von TSH (1 mU/ml), Forskolin und Methimazol (1 mM) auf Zellkulturen von Basedow-Patienten untersucht. TSH und Forskolin erhöhten die NIS-mRNA deutlich nach 24 h, die NIS-Proteinmenge erst nach 48 h. Methimazol hatte weder in Kombination mit TSH noch allein einen statistisch signifikanten Effekt auf die NIS-Expression. Die Unterschiede der Ergebnisse führt Spitzweg auf die unterschiedlichen Zellkulturen und unterschiedliche Methimazolkonzentrationen zurück.

In unserer Arbeit wurde eine deutlich höhere Konzentration von Methimazol (40 mM) als bei Saito (1 mM) benutzt, welche bei einer Inkubationszeit von insgesamt 2 h schon eine deutliche

Reduktion der Nuklid Aufnahme bewirkte. Inwiefern sich Methimazol in dieser Zeitspanne auf die Gen- und Proteinexpression auswirkt, kann nur gemutmaßt werden, ließe sich aber durch Northern Blot oder Proteinbestimmung überprüfen. Eine Aktivierung der Genexpression des NIS und damit ebenso die Erhöhung des Proteingehaltes scheint unwahrscheinlich, da die Aufnahme von ^{188}Re -Perrhenat reduziert und nicht erhöht war. Am ehesten vermuten wir Sättigungs- bzw. Verdrängungseffekte als Ursache für die verringerte Nuklid Aufnahme. Zu 1 ml Medium wurden 40 mM Methimazol, aber nur $1,47 \times 10^{-8}$ mM ^{188}Re -Perrhenat zugesetzt. Die Konzentration von Methimazol ist somit um ein Vielfaches höher als die des Rheniums. Somit könnte die große Menge der Moleküle des Methimazols den Uptake des ^{188}Re -Perrhenats behindern. Ein weiterer Grund könnte eine geringe Affinität des Methimazols (im Vergleich mit Perchlorat, es wurde in gleicher Konzentration -40 mM- zugesetzt) zum NIS darstellen.

In einer Arbeit von Carlin et al. wurde der Einfluss von Methimazol (1 mM) und Perchlorat (1 mM) an transfizierten UVW-Zellen getestet (Inkubationszeit 30 min., 37°C und 4°C) [9]. Weder $^{211}\text{Astatid}$ noch $^{131}\text{Iodid}$ wurden in ihrer Uptakekinetik durch Methimazol beeinflusst (im Gegensatz zu Perchlorat, wie oben bereits beschrieben). Da es sich bei Perchlorat um eine sofort wirksame kompetitive Hemmung des NIS handelt, reicht der Zeitraum von wenigen Minuten für dessen Wirkungsentfaltung bereits aus. Der Methimazoleinfluss ist möglicherweise zeitabhängig. Dies könnte bedeuten, dass langsame, intrazelluläre Prozesse (z.B. über die Beeinflussung des RNA-levels) oder zeitaufwendige Prozesse an der Membran zur Uptakehemmung führen. Dazu sollten kinetische Untersuchungen erfolgen.



⊗ energieunabhängiger Transportmechanismus

Abb.15 Schematische Darstellung der Interaktion von Perchlorat und Methimazol an der FRTL5

Abbildung 15 soll die voran stehend diskutierten Aspekte nochmals zusammenfassen. Die Blockade des NIS durch Perchlorat und die Reduzierung der NIS-mRNA durch Methimazol sind bereits wissenschaftlich belegt worden [19, 62]. Die Wirkung von Methimazol am NIS könnte durch kompetitive Hemmung erklärt werden. Der von uns anhand unserer Ergebnisse vermutete energieunabhängige Transporter und die Wechselwirkungen mit Perchlorat und Methimazol sind ebenfalls in Abbildung 15 dargestellt.

4.2.1. Dosimetrie unter Beachtung eines intrazellulären Uptakes

Ausgangspunkt für die Dosimetrie war das MIRD-Kugelmodell. Es erlaubt unter Annahme einer homogenen sphärischen Aktivitätsverteilung die Berechnung der Dosis über S-Werte. Demnach bewirken 100 MBq ^{188}Re in einer Kugel mit einem Volumen von 2 ml eine Dosis von 18,8 Gy nach einstündiger Expositionsdauer.

Dieses Modell berücksichtigt allerdings keine zelluläre Aktivitätsanreicherung (wie sie bei FRTL5 vorliegt) und gilt nur für sphärische Bestrahlungsgeometrien. Zudem findet die Adhärenz der von uns verwendeten Zelllinien keine Berücksichtigung. Bei der durch uns durchgeführten Bestrahlung in 6-Well-MTP mit einem Durchmesser von 36 mm entspricht ein Volumen von 2 ml einer Füllhöhe von 2 mm. Aufgrund der starken Abweichung vom Kugelmodell und der hohen maximalen β -Reichweite des ^{188}Re (1,046 cm) [35], sowie der Anreicherung von Aktivität im Zytoplasma wurde ein anderer Zugang zur Dosisberechnung gewählt. Dazu wurde die Gesamtdosis in der Zelle aufgrund der extra- und intrazellulären Bestrahlung getrennt betrachtet. Mit Hilfe von Beta-Dose-Point-Kernels [54] wurde zunächst der extrazelluläre Dosisbeitrag zu 8,7/26,1 Gy bei 100/300 MBq Ausgangsaktivität ^{188}Re bestimmt.

Bei einem gemessenen Uptake von 9,41 % nach einer Stunde in $2 \cdot 10^6$ Zellen entspricht dies (4,7/14,1) Bq pro Zelle. Dieser Uptake bewirkt eine 180-fach höhere Aktivitätskonzentration intrazellulär verglichen mit dem umgebenden Medium. Mittels tabellierter zellulärer S-Werte [29] wurde bei einstündiger Bestrahlung ein zusätzlicher Dosisbeitrag von 9,4/28,2 Gy erzielt (intrazellulärer Beitrag). Die daraus resultierende Gesamtdosis von 18,1 Gy bei 100 MBq entspricht dem 0,96-fachen Wert der entsprechende MIRD-Kugelannahme.

Bei Blockade des NIS mit Perchlorat an FRTL5 ist zu beachten, dass die Gesamtdosis nur aus der extrazellulären Bestrahlung resultiert.

Die Tabelle 3 gibt für die berechneten Dosen nochmals einen Überblick.

Tab.3 Für 100 und 300 MBq sind die sich aus einem intra- und extrazellulären Anteil zusammensetzenden Gesamtdosen aufgeführt.

Aktivität ^{188}Re	Dosisbeitrag extrazellulär	Dosisbeitrag intrazellulär	Gesamtdosis
100 MBq	8,7 Gy	9,4 Gy	18,1 Gy
300 MBq	26,1 Gy	28,2 Gy	54,3 Gy

Wenn der Vergleich zwischen FRTL5 nach externer Röntgenbestrahlung und Perrhenatbestrahlung bei 15 Gy/300 MBq nun aber ähnliche OTM-Werte ergab (Abb.9, Abb.12), erscheint eine Gesamtdosis von 82,5 Gy bei einer Aktivität von 300 MBq ^{188}Re als eine zu hoch angenommene Dosis. Eine Möglichkeit in der Diskrepanz zwischen tatsächlichem OTM und höherer angenommener Gesamtdosis könnte das Follikelwachstumsbestreben von FRTL5 [32] sein. Dies schränkt die homogene Bestrahlung aller Schilddrüsenzellen ein, da mehrere Zelllagen übereinander liegen und könnte zu dem geringeren als bei obenstehender Gesamtdosis erwarteten OTM beigetragen haben.

Zudem ist zu beachten, dass es durch die Bestrahlung in 6-Well-MTP bei Zellen in Randlage der Kavitäten zu einem Dosisabfall kommt (radialer Abfall), da an dieser Stelle die Bestrahlung nicht mehr von allen Seiten erfolgt. Dieser Umstand könnte ebenso zu einem geringeren OTM führen. Die beiden genannten Gründe sind aber nicht ausreichend, um die Diskrepanz zwischen errechneter Dosis und erhaltener Schädigung zu begründen. Daher sollten weitere Untersuchungen zur Mikrodosimetrie vorgenommen werden.

4.3. Modulation der Strahlenwirkung

Strahlung, egal welcher Natur, hat physikalische, chemische und biologische Wirkungen auf die Zelle, deren Folgen sich in unterschiedlichen Zeiträumen an der Zelle manifestieren. 99 % der Strahlenenergie führen zur Radiolyse des Wassers, eine der wichtigsten indirekten Strahlenwirkungen auf die Zelle [26]. Aus Wasser entstehen nach Energieeinwirkung H_2O^+ und e^- . Durch die angeregten Elektronen können OH^\cdot , O_2^- und H_2O_2 im Zyto- und Karyoplasma entstehen. Diese Radikale sind befähigt, durch Wechselwirkung an der DNA Schäden zu verursachen. Bei niedriger LET sollen 65 % aller DNA Strand Breaks durch OH^\cdot -Radikale entstehen [66]. Bei direkter Schädigung der DNA wird die Energie direkt auf die DNA übertragen und es kommt zur Ionisierung von Basen und Zuckermolekülen. Die Wahrscheinlichkeit ist umso größer, desto höher der LET ist [36].

Die Strahlenwirkung kann durch Zugabe von Mediatoren beeinflusst werden, eine Sensibilisierung oder Protektion der Zellen ist möglich.

4.3.1. Beeinflussung der Wirksamkeit der Röntgenstrahlung

4.3.1.1. Einfluss von Methimazol auf FRTL5 und PC3 unter externer Bestrahlung

Methimazol wird in der Therapie der Hyperthyreose eingesetzt. Es hemmt die Thyroidperoxidase (TPO) und somit die Thyreoglobulin-Iodination. Zudem hat MMI zahlreiche extrathyroidale Wirkungen. Es hemmt die Lactat- und Myeloperoxidase (LPO/MPO), stimuliert die Pepsinogen- und Magensäureproduktion, wirkt immunsuppressiv und antiinflammatorisch [5, 69]. Zudem ist seine Eigenschaft als H_2O_2 -Scavenger beschrieben worden [22, 39, 68, 69]. Wie schon unter 2.1.3. beschrieben, erleichtert MMI den Elektronentransfer von NADPH zu H_2O_2 und sorgt somit für eine schnellere Reduktion der DNA-schädigenden Substanz Wasserstoffperoxid zu Wasser.

In unseren Versuchen zeigte sich die protektive Wirkung des MMI (0,04 M, Vorinkubation über 1 h bei 37°C) sowohl an FRTL5 als auch an PC3 bei 4°C . Es war für beide Zellarten zwischen der unbehandelten Probe und der Probe mit MMI bei einer Dosis von 15 Gy stets ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) nachweisbar.

Für FRTL5 wurde die Bestrahlung mittels Röntgenröhre auch bei 37°C durchgeführt, auch hier bestätigte sich die Protektion der Zelle durch MMI.

Die protektive Eigenschaft des MMI ist durch seine Funktion als Scavenger zu erklären. Die unter Bestrahlung entstehenden freien Radikale können durch Methimazol schneller eliminiert und die DNA somit geschützt werden. Dieser Effekt sollte unspezifisch sein, da er sowohl bei 4°C als auch bei 37°C und an beiden Zelllinien auftritt.

Kim et al. zeigten neben dem immunmodulatorischem Effekt von MMI seine Wirksamkeit auf die H_2O_2 -Elimination in vitro an FRTL5 [39]. MMI wurde in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt und reduzierte innerhalb von 5 min die H_2O_2 -Konzentration in $\text{INF-}\gamma$ (100 U/ml) stimulierten FRTL5 um 50 % (um 99 % in 100 min, 37°C). Mit Hilfe von 2-7-Dichlorofluoresceindiacetat (DCFH-DA) konnte über Fluoreszenzmessung die Menge an verbliebenem intrazellulären H_2O_2 bestimmt werden. Die schnelle Elimination von Wasserstoffperoxid führten Kim et al. auf einen erleichterten Elektronentransfer von NADPH zu H_2O mittels Thioredoxin oder Glutathion zurück. Die SH-Gruppe des Imidazolringes stellt das Redoxpotential des MMI dar.

Weetman et al. inkubierten Monozyten 5 min bei 37°C mit Luminol 0,02 mmol/l mit oder ohne Zugabe von MMI (0,02-1,0 mmol/l) [68]. Als Stimulans der H_2O_2 -Bildung diente Zymosan (Produkt aus Zellwänden von *Saccharomyces cerevisiae*) und gemessen wurde die luminolabhängige Chemolumineszenz von intrazellulär reduziertem H_2O_2 . MMI in einer

Konzentration von 0,1 mM reduzierte die Chemolumineszenz um 59 %. Die externe Peroxidasehemmung von MMI und H_2O_2 -Produktion wurde durch Bestimmung mittels Spectrophotometrie in 96-Wellplatten an Phorbol-Myristat-Acetat (200 nmol/l) stimulierten Monozyten gemessen. Hierbei reduzierte MMI (0,1 mM) die Chemoluminiszenz um 50 %. Sie erklärten die Ergebnisse mit einer Scavengerfunktion oder Inhibition der Radikalentstehung durch MMI.

Ferreira et al. untersuchten die inhibierende Wirkung von MMI auf die NADPH-Oxidase (produziert H_2O_2) an humane Schilddrüsenzellen in vitro [22]. Wenn 0,04 mM MMI zu einer Lösung mit 4,0 mM H_2O_2 gegeben worden, senkte Methimazol den H_2O_2 -Gehalt signifikant. Um die Wirkung direkt auf die Oxidase zu testen, wurden humane Schilddrüsenzellen isoliert, lysiert und die Oxidase separiert. Nach Zugabe von MMI wurde nach 20 min Inkubationszeit bei 30°C der H_2O_2 -Gehalt der Lösung gemessen. 0,01 mM MMI genügten zur Inhibierung der NADPH-Oxidase, jedoch reicht diese Konzentration nicht aus, um den Scavenger-Effekt auf Wasserstoffperoxid darzustellen.

Wenn die Elimination der radikalen Substanz schon innerhalb von Minuten stattfindet, scheint die Protektion durch MMI während der Röntgenbestrahlung sehr wahrscheinlich. Weiterführende Experimente könnten die Wirkung des MMI ohne Präinkubation bei 4/37°C untersuchen, da ein Scavengereffekt ohne vorherige Inkubation auftreten sollte. Zudem ist unklar, ob es sich um einen intra- oder extrazellulären Wirkmechanismus handelt, da die Aufnahmefähigkeit von PC3 in Bezug auf MMI unbekannt ist. Über eine Zugabe von radioaktiv markiertem MMI wäre der intrazelluläre Anteil sowohl bei PC3 als auch FRTL5 detektierbar. Zudem könnte eine getrennte Messung der extra- und intrazellulären H_2O_2 -Reduktion mit oder ohne Zusatz von MMI mittels DCFH-DA Aufschluss zu dieser Thematik geben.

4.3.1.2. Wirksamkeit von Nicotinamid auf FRTL5 und PC3 bei externer Bestrahlung

Für Nicotinamid konnte keine sensibilisierende Wirkung festgestellt werden. Nicotinamid entfaltet seine Wirkung vorrangig unter hypoxischen Bedingungen. Es verstärkt in vivo die regionale Durchblutung und erhöht somit innerhalb kurzer Zeit die Sauerstoffverfügbarkeit für hypoxische Zellen [73]. Außerdem hemmt Nicotinamid die Poly-ADP-Ribose-Polymerase, ein Enzym, welches in DNA-Reparaturprozesse eingebunden ist [58]. Für den Nachweis der Wirksamkeit des Nicotinamids sollten eventuell zukünftige Versuchsreihen unter Sauerstoffmangel der Zellkultur durchgeführt werden.

4.3.1.3. Einfluss von Perchlorat auf FRTL5 und PC3 unter externer Bestrahlung

Perchlorat, ebenfalls ein Thyreostatikum, zeigte bei der Bestrahlung mittels Röntgenröhre (4°C) auf die FRTL5 sowohl bei 5 als auch bei 15 Gy einen signifikanten protektiven Effekt. Dieser war bei PC3 nicht zu sehen. Die externe Strahlenwirkung bei FRTL5 wurde durch Perchlorat bei 15 Gy auf ein Drittel reduziert (OTM 11,73 auf OTM 3,99). Der Mediator wurde in einer Konzentration von 0,04 M verwendet und die Proben jeweils eine Stunde bei 37°C vorinkubiert.

Für Perchlorat ist lediglich sein inhibitorischer Effekt auf den NIS beschrieben, damit allerdings ist die Verringerung des OTM unter externer Bestrahlung nicht erklärbar. Da zudem keine Wirkung von Perchlorat auf PC3 erkennbar ist, scheint es sich um einen auf die Schilddrüsenzelle begrenzten Effekt zu handeln. Bisher gibt es in der Literatur keinen Hinweis auf eine protektive Funktion des Perchlorats als Scavenger. Eine Möglichkeit zur Klärung einer eventuellen radikaleliminierenden Funktion des Perchlorats böte, analog zum MMI, die Fluoreszenzmessung mittels DCFH-DA. So könnte auch eine Aufnahme Perchlorats in die PC3 vollständig ausgeschlossen werden. Eine Abstufung der zugegebenen Mengen an Perchlorat sollte zudem einen Bereich erkennen lassen, in welchem der protektive Effekt auftritt.

4.3.2. Beeinflussung der Wirksamkeit von ^{188}Re

4.3.2.1. Einfluss von Methimazol auf FRTL5 und PC3 unter ^{188}Re -Bestrahlung

^{188}Re wird durch den NIS in die FRTL5 aufgenommen. Somit kommt im Gegensatz zur rein äußeren Bestrahlung der Zellen mittels Röntgenröhre ein intrazellulär wirksamer Anteil hinzu. Dieser beträgt 2 % bei 4°C und 10 % bei 37°C, wobei der Uptake um 10 % einer Dosisverdopplung in Bezug auf den Zellkern entspricht.

Wurden FRTL5 bei 4°C mittels ^{188}Re bestrahlt, zeigte MMI (0,04 M, bei allen Versuchen erfolgte eine Präinkubation mit MMI über 1 h) bei 300 MBq keinen protektiven Effekt, bei 100 MBq hingegen war noch eine signifikante Protektion durch MMI vorhanden. Bei 37°C hingegen war der protektive Effekt des MMI sowohl bei 100 als auch bei 300 MBq deutlich erkennbar. Wie unter 4.3.1.1. erläutert, entsteht die Protektion durch MMI aufgrund seines Potentials zur schnellen Elimination von radikalen Sauerstoffspezies. Die geringere Effektivität des MMI unter 4°C-Bedingungen könnte durch die eingeschränkte Funktionsfähigkeit elektronentransferierender Prozesse [39] und einem zusätzlich intrazellulär wirksamen ^{188}Re -Anteil erklärbar sein. Die radikaleliminierende Eigenschaft des MMI könnte somit für eine Aktivität von 100 MBq noch ausreichend sein, seine Kapazität bei 300 MBq jedoch

überschreiten. Dies könnte über eine Änderung der MMI-Konzentration zu klären versucht werden, allerdings sollten vorher toxische Wirkungen bei Konzentrationssteigerung ausgeschlossen werden.

Bei 37°C ist neben dem protektiven Effekt des MMI auch die Möglichkeit des Repairs der Zelle zu beachten. Auch die Vorgänge des Elektronentransfers und Reduktion des Wasserstoffperoxides sollten nun mit höherer Effektivität ablaufen, sodass trotz eines höheren ¹⁸⁸Re-Anteils in den Zellen die Protektion deutlicher wird.

Die unter 4.3.1.1. diskutierten Arbeitsgruppen [22, 39, 68] führten ihre Versuche nicht unter 4°C-Bedingungen durch, ein Vergleich zu den hier vorliegenden Resultaten ist somit nur eingeschränkt möglich.

Auch eine Diskussion der Wirksamkeit von MMI auf mRNA-Ebene erscheint aufgrund der Kürze der Einwirkungszeit auf die Zellkultur nicht sinnvoll. So konnten z.B. Leer et al. abhängig von der Inkubationszeit von MMI (10 mM, 37°C) in humanen Schilddrüsenzellen und FRTL5 eine Steigerung des Tg mRNA Gehaltes erst nach 2-4 h zeigen [42]. Der Mechanismus der Transkriptionsbeeinflussung blieb unbekannt.

PC3 zeigten unter Bestrahlung (4°C) mit ¹⁸⁸Re ebenfalls eine Beeinflussbarkeit durch MMI. Auch hier zeigte sich die protektive Wirkung. Bei 100 MBq erfolgte eine Reduktion des OTM um ein Drittel, bei 300 MBq um ein Viertel (100 MBq: OTM unbehandelte Probe 9,09; mit MMI 5,81; 300 MBq: OTM unbehandelte Probe 26,77; mit MMI 20,49). Da in diesem Fall kein Rhenium intrazellulär aufgenommen werden kann (kein NIS, Uptakeversuche für PC3 fielen negativ aus), besteht eine rein extrazelluläre Bestrahlung. Die Scavengerwirkung des MMI scheint hier effektiver, als bei den unter 4°C-Bedingung bestrahlten FRTL5. Dies würde die Vermutung der ineffektiveren Wirksamkeit des MMI bei Vorliegen von gleichzeitiger intra- und extrazellulärer Bestrahlung bestätigen.

Wenn es sich bei der Protektion der PC3 um einen intrazellulären Effekt handeln würde, könnte analog zur Bestrahlung durch die Röntgenröhre radioaktiv markiertes MMI zur Klärung der intrazellulären Aufnahme zur Zellkultur zugegeben werden. Würde es sich nicht intrazellulär anreichern, wäre die Konsequenz, eine im Extrazellularraum vorhandene Wirkung anzunehmen.

4.3.2.2. Beeinflussung der ¹⁸⁸Re-Bestrahlung von FRTL5 und PC3 durch Nicotinamid

So wie bei der Bestrahlung durch die Röntgenröhre konnte auch bei der ¹⁸⁸Re-Bestrahlung keine Erhöhung der OTM-Werte und somit eine Zunahme der Sensibilität der FRTL5 oder PC3

gefunden werden. Wie schon unter 4.3.1.2. diskutiert, sollte die fehlende hypoxische Umgebung der Grund für den ausbleibenden Effekt darstellen.

4.3.2.3. Wirksamkeit von Perchlorat auf die Bestrahlung mit ^{188}Re von FRTL5 und PC3

Auf den Wirkmechanismus von Perchlorat wurde unter Kapitel 4.2. näher eingegangen. Die kompetitive Blockade des NIS sollte nunmehr auch in einer Reduktion des OTM bei FRTL5 nicht jedoch bei PC3 nachweisbar sein.

Unter 4°C und 37°C-Bedingungen erfolgte bei FRTL5 bei 100 und 300 MBq eine signifikante Reduktion des OTM (100 MBq OTM 4°C: unbehandelte Probe 5,14; mit Perchlorat 2,91; OTM 37°C: unbehandelte Probe 10,77; mit Perchlorat 1,31; 300 MBq OTM 4°C: unbehandelte Probe 11,28; mit Perchlorat 6,00; OTM 37°C: unbehandelte Probe 25,50; mit Perchlorat 4,00). Die Wirkung des Perchlorat ist mit dem Comet Assay in Form des OTM sehr gut darstellbar.

Da der intrazelluläre Anteil ^{188}Re -Perrhenats durch die Hemmung des NIS sehr gering ist, sollten die OTM-Werte dieser Zellen mit den unbehandelten Proben der durch die Röntgenröhre bestrahlten Zellen vergleichbar sein. Da die Bestrahlungszyklen (Röntgenröhre und ^{188}Re für FRTL5) einen größeren zeitlichen Abstand zueinander hatten, können jedoch die absoluten Werte nicht miteinander verglichen werden.

An PC3 lässt sich unvermuteter Weise eine geringe, aber signifikante Reduzierung des OTM bei 300 MBq unter 4°C-Bedingungen nachweisen (von 26,8 der unbehandelten Probe auf ein OTM von 22,3 mit Perchlorat). Eine unspezifische Wirkung des Perchlorats muss vermutet werden. Wäre es ein Prozess auf Scavengerebene, müsste der protektive Effekt schon bei der Bestrahlung durch die Röntgenröhre nachweisbar gewesen sein. Eine Wechselwirkung mit Membranbestandteilen oder intrazellulären Signalwegen von Perchlorat an PC3 ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

4.4. Beurteilung von methodischen Limitationen auf die Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung und Interpretation der Analysewerte unterlag durch verschiedene, sich während der Versuchsdurchführung ergebene Aspekte, einigen Einschränkungen.

Die Wichtigste war die eingeschränkte Vergleichbarkeit beider Strahlenqualitäten aufgrund der Bestrahlungsgeometrie beim ^{188}Re . Die Dosiskalkulation erwies sich schwieriger, als vorher angenommen, und ergab für die Radionuklidbestrahlung bei FRTL5 eine 3-fach höhere Dosis

als durch die Röntgenröhre appliziert wurde (s.a.Tab.3, 4.2.1.). Die OTM einer Zellart nach Röntgenbestrahlung konnten somit nicht direkt mit dem analog mit ^{188}Re durchgeführten Versuch verglichen werden.

Eine weitere Einschränkung war, dass die Ergebnisse nicht in ihren absoluten Werten reproduzierbar waren, sondern nur das Verhältnis der OTM-Werte zueinander. Versuche, welche in einem Abstand von mehreren Monaten voneinander durchgeführt worden, zeigten nie die gleichen Werte. Eine mögliche Ursache dafür sind die individuellen Eigenschaften der Zellkulturen. Da nicht für alle Experimente die gleiche Ursprungspassage verwendet wurde, können Abweichungen in den Werten aufgrund der individuellen Eigenschaften des biologischen Systems entstehen. So könnten unterschiedliche Scavenger-Kapazitäten der Zellen verantwortlich für eine effektivere oder geringere H_2O_2 -Elimination sein und somit zu geringerer oder stärker geschädigten Zellen führen [21].

Moller et al. beschrieben in ihrem Review große intra-, interindividuelle und Assay Variationen der Methode Comet Assay [45]. Zwar beziehen sich ihre Daten auf Lymphozyten humaner Spender, die Variabilität der Ergebnisse wird durch Faktoren wie Alter, Nikotinabusus, Ernährungsgewohnheiten, sportliche Aktivität, Infektionen usw. begründet. Auch Zellkulturen unterliegen Umwelteinflüssen und haben individuelle Kapazitäten, z.B. der Peroxidase oder Reparaturenzyme. Dies könnte zum einen zur hohen Standardabweichung zum anderen zu der Nichtreproduzierbarkeit genau gleicher Werte beitragen.

Auch die Vergleichbarkeit der beiden Zelllinien untereinander unterliegt der eingeschränkten Beurteilbarkeit aufgrund sehr unterschiedlicher Ablösezeiten. Während sich PC3 innerhalb von 5 min von den Well-Platten lösen ließen, erstreckte sich die Ablösezeit von FRTL5 über 30 bis 45 min. In dieser Zeit fanden Reparaturprozesse in den Zellen statt, da der Vorgang der Ablösung bei 37°C ablief. Ein direkter Vergleich der Strahlenschäden war nicht möglich, da keine Möglichkeit für die Erfassung des „wahren“ Initialschadens der FRTL5 gegeben war. Wurden FRTL5 vor Zugabe der Mediatoren und Bestrahlung abgelöst, war der 0-Wert schon so signifikant erhöht, so dass die erhaltenen OTM-Werte nach Bestrahlung nicht zuverlässig erschienen.

Chico Galdo et al. wiesen 2006 die DNA-Schädigung von Acrylamid an den Rattenschildrüsenzelllinien FRTL5 und PCCL3 mit verschiedenen Methoden nach. Sie entschieden sich gegen die Verwendung von FRTL5 für den Comet Assay, da diese Zelllinie ein hohes Maß an Aneuploidie aufweist und sich ihre zellspezifischen Eigenschaften von Labor zu Labor unterscheiden können [11]. Die in unseren Versuchen angefallenen langen Ablösezeiten könnten auf solche Änderungen der Eigenschaften von FRTL5 beruhen.

Eine hohe Standardabweichung und Schwankungsbreite der OTM-Werte in höheren Dosisbereichen erschwert zudem die Interpretation der Ergebnisse. Eine höhere Anzahl ausgewerteter Zellen pro Objektträger könnte die eindeutige Aussagefähigkeit der Ergebnisse erhöhen, obwohl die statistische Aussagefähigkeit (5 % Signifikanz) bei 263 analysierten Zellen gegeben sein soll (es wurden in dieser Arbeit 300 Einzelwerte pro Versuchsreihe bestimmt) [12, 55].

Olive et al. zeigten die Heterogenität von DNA-Schäden an Maustumorzellen (SCCVII) und Makrophagen nach externer Bestrahlung mit 15 Gy x-ray in vitro [49]. Es wurden je 200 Zellen analysiert. Die OTM-Werte verteilten sich zwischen 0 und 24, wobei der Großteil der Zellen einen DNA-Schaden von OTM 5-15 aufwies. Trotz einer großen Menge ausgewerteter Zellen ergab sich eine signifikante Heterogenität der Werte. Dies schränkt die Aussagefähigkeit des Comet Assays hinsichtlich geringer Veränderungen im OTM ein.

Weitere Einflussparameter auf die Ergebnisse des Comet Assays sind Veränderungen der Lyse- und Elektrophoretetemperatur [61], Unregelmäßigkeiten in der Struktur der Agarose nach Auftragen auf den Objektträger, die Position der Zellen auf dem beschichteten Objektträger und UV-Lichteinfluss [49].

Speit et al. untersuchten das Verhalten des OTM an humanen Vollblut und V79 Chinesischen Hamsterzellen nach ^{60}Co -Bestrahlung durch Variation der alkalischen Lyse- und Elektrophoretetemperatur (4°C/Raumtemperatur) [61]. Bei Raumtemperatur war das OTM um das fünffache gegenüber dem analog bei 4°C durchgeführten Versuch erhöht. Durch Kühlung und Elektrophorese im Eisbad wurde in unserer Arbeit versucht, die Temperaturbedingungen konstant zu halten. Eine Erhöhung des OTM der im Sommer durchgeführten Versuchsreihen gegenüber denen im Winter war somit nicht festzustellen, sodass der Einfluss von Temperaturunterschieden in unserer Arbeit vernachlässigbar zu sein scheint.

Ein weiterer zu beachtender Faktor ist, dass mit dem Comet Assay keine Apoptoseraten quantitativ erfasst werden können [23]. Zwar gelingt die Beurteilung, ob es sich um eine intakte, geschädigte oder apoptotische Zelle handelt, da aber die Messung der DNA-Schädigung unmittelbar nach Bestrahlung erfolgte, kann keine Aussage zum weiteren Verhalten der Zellen hinsichtlich Auslösung einer Apoptose getroffen werden.

Del Terra et al. untersuchten das Apoptoseverhalten an FRTL5 nach UV-C-Bestrahlung im Abstand von 24, 48, 72, 96 und 120 h mittels Gelelektrophorese [17]. Nach 24 h schien die DNA intakt, aber nach 48 h war eine DNA-Fragmentation erkennbar. Sie schlussfolgerten, dass die Aktivierung des Apoptoseprozesses in normalen Zellen mehr Zeit benötigt als vergleichsweise in transformierten oder Tumorzellen. Dies lässt vermuten, dass bei Analyse der FRTL5 unmittelbar nach Bestrahlung mit dem Comet Assay die potentiell in Apoptose

gehenden Zellen als intakt erfasst werden. Folglich kann wiederum keine exakte Aussage zur Apoptoserate getroffen werden.

5. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob verschiedene Strahlenqualitäten Einfluss auf das Ausmaß des DNA-Schadens haben und ob dieser durch zugesetzte Mediatoren beeinflusst werden kann. Zum Nachweis der DNA-Schädigung an der Einzelzelle wurde der Comet Assay gewählt, ein Verfahren, bei dem Zellen auf agarosebeschichtete Objektträger aufgetragen und nach elektrophoretischer Auftrennung von intakter und geschädigter DNA durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden. Analyseparameter war das Olive Tail Moment (OTM). Für die Versuche wurden FRTL5, eine Rattenschilddrüsenzelllinie, und PC3, eine humane Prostatkarzinomzelllinie, verwendet. FRTL5 ist Natrium-Iodid-Symporter positiv. Dies bedeutet, dass neben Iodid-Anionen auch strukturell ähnliche Anionen wie Perchlorat und ^{188}Re -Perrhenat über diesen Aufnahmemechanismus transportiert werden können.

Bestrahlt wurden die Zelllinien mittels Röntgenröhre und ^{188}Re -Perrhenat unter Zusatz von Methimazol, Nicotinamid oder Perchlorat mit 5 Gy/15 Gy bzw. 100 MBq/300 MBq. Bei FRTL5 ergab sich hinsichtlich der Strahlenqualitäten kein signifikanter Unterschied im OTM. Die gewählten Radioprotektoren Perchlorat und Methimazol hingegen reduzierten mit einer Ausnahme sowohl bei 4°C, als auch bei 37°C unabhängig von der Strahlungsart den DNA-Schaden. Nur bei 300 MBq ^{188}Re -Perrhenat 4°C blieb Methimazol wirkungslos.

PC3 zeigten nach der Bestrahlung durch ^{188}Re -Perrhenat einen dreifach höheren OTM-Wert gegenüber der Bestrahlung durch die Röntgenröhre. Perchlorat hatte keinen Effekt bei der Röntgenstrahlung, wirkte jedoch protektiv während der Bestrahlung von PC3 durch Perrhenat. Methimazol reduzierte die DNA-schädigende Wirkung beider Strahlenqualitäten auch an dieser Zelllinie signifikant. Nicotinamid zeigte bei keinem der durchgeführten Versuche eine radiosensibilisierende Wirkung.

Perchlorat blockiert den NIS kompetitiv, diese Hemmung erklärt die radioprotektive Wirkung bei der Perrhenatbestrahlung von FRTL5. Sie ist aber keine Erklärung für die Protektion von PC3 unter Perrhenat- (NIS negativ) und FRTL5 unter Röntgenbestrahlung. So ist zu vermuten, dass Perchlorat unspezifische Scavengereigenschaften besitzen könnte.

Methimazol besitzt durch seine SH-Gruppe radikaleliminierende Eigenschaften. Durch diese ist seine strahlenprotektive Wirkung erklärbar.

Parallel dazu wurden Uptakeversuche an FRTL5 mit Perchlorat und Methimazol bei 4°C und 37°C durchgeführt. Nicht nur Perchlorat, sondern auch Methimazol hemmte die Aufnahme von ^{188}Re -Perrhenat, wenn auch weniger effektiv. Demzufolge scheint auch Methimazol ein Hemmstoff für den NIS zu sein.

Es bleibt allerdings zu klären, ab welcher Konzentration die hemmende Wirkung auf den Uptake von Perrhenat und andere Nuklidanionen auftritt, da diese Erkenntnis auch Einfluss auf die Iodidaufnahme unter Methimazoltherapie (z.B. bei geplanter Radioiodgabe) haben könnte.

Die unspezifische Wirkweise des Perchlorats sollte zunächst mit anderen DNA-Schäden detektierenden Methoden nachvollzogen werden. Zudem könnte in weiterführenden Untersuchungen für beide Mediatoren der genaue Wirkungsort (extra- und/oder intrazellulär) ihrer radikaleliminierenden Eigenschaften durch radioaktive Markierung der Stoffe oder mit Hilfe eines in reduzierter Form intrazellulär verbleibendem Fluoreszenzfarbstoffes zu klären versucht werden.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Adams, G.E.; Jameson, D.G.: Time effects in molecular radiation biology. *Radiat Environ Biophys* (1980) 17; 95-113
- [2] Ambesi-Impiombato, F.S.; Parks, L.A.; Coon, H.G.: Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1980) 77; 3455-9
- [3] Archer, B.R.: Recent history of the shielding of medical x-ray imaging facilities. *Health Phys* (2005) 88; 579-86
- [4] Balazs, C.; Kiss, E.; Leovey, A.; Farid, N.R.: The immunosuppressive effect of methimazole on cell-mediated immunity is mediated by its capacity to inhibit peroxidase and to scavenge free oxygen radicals. *Clin Endocrinol (Oxf)* (1986) 25; 7-16
- [5] Bandyopadhyay, U.; Biswas, K.; Banerjee, R.K.: Extrathyroidal actions of antithyroid thionamides. *Toxicol Lett* (2002) 128; 117-27
- [6] Bidey, S.P.; Chiovato, L.; Day, A. et al.: Evaluation of the rat thyroid cell strain FRTL-5 as an in-vitro bioassay system for thyrotrophin. *J Endocrinol* (1984) 101; 269-76
- [7] Bocker, W.; Bauch, T.; Muller, W.U.; Streffer, C.: Image analysis of comet assay measurements. *Int J Radiat Biol* (1997) 72; 449-60
- [8] Carlin, S.; Akabani, G.; Zalutsky, M.R.: In vitro cytotoxicity of (211)at-astatide and (131)I-iodide to glioma tumor cells expressing the sodium/iodide symporter. *J Nucl Med* (2003) 44; 1827-38
- [9] Carlin, S.; Mairs, R.J.; Welsh, P.; Zalutsky, M.R.: Sodium-iodide symporter (NIS)-mediated accumulation of [(211)At]astatide in NIS-transfected human cancer cells. *Nucl Med Biol* (2002) 29; 729-39
- [10] Chaplin, D.J.; Trotter, M.J.; Skov, K.A.; Horsman, M.R.: Modification of tumour radiation response in vivo by the benzamide analogue pyrazinamide. *Br J Cancer* (1990) 62; 561-6
- [11] Chico Galdo, V.; Massart, C.; Jin, L. et al.: Acrylamide, an in vivo thyroid carcinogenic agent, induces DNA damage in rat thyroid cell lines and primary cultures. *Mol Cell Endocrinol* (2006) 257-258; 6-14
- [12] Clauß, G.; Finze, F.-R.; Partzsch, L.: Statistik für Soziologen, Pädagogen, Psychologen und Mediziner. ed. Frankfurt am Main: Verlag Harri Deutsch, 1995
- [13] Cohen, G.; Heikkila, R.E.; Allis, B. et al.: Destruction of sympathetic nerve terminals by 6-hydroxydopamine: protection by 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourea, diethyldithiocarbamate, methimazole, cysteamine, ethanol and n-butanol. *J Pharmacol Exp Ther* (1976) 199; 336-52

- [14] Collins, A.R.: The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* (2004) 26; 249-61
- [15] Cosset, J.M.; Maher, M.; Habrand, J.L.: New particles in radiotherapy: an introduction. *Radiat Environ Biophys* (1995) 34; 37-9
- [16] Dai, G.; Levy, O.; Carrasco, N.: Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* (1996) 379; 458-60
- [17] Del Terra, E.; Francesconi, A.; Meli, A.; Ambesi-Impiombato, F.S.: Radiation-dependent apoptosis on cultured thyroid cells. *Phys Med* (2001) 17 Suppl 1; 261-3
- [18] Deschavanne, P.J.; Fertil, B.: A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1996) 34; 251-66
- [19] Dohan, O.; De la Vieja, A.; Paroder, V. et al.: The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev* (2003) 24; 48-77
- [20] Eggo, M.C.; Bachrach, L.K.; Mak, W.; Burrow, G.N.: Disparate uptake of $^{99m}\text{TcO}_4^-$ and $^{125}\text{I}^-$ in thyroid cells in culture. *Horm Metab Res* (1986) 18; 167-72
- [21] Fairbairn, D.W.; Olive, P.L.; O'Neill, K.L.: The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* (1995) 339; 37-59
- [22] Ferreira, A.C.; de Carvalho Cardoso, L.; Rosenthal, D.; de Carvalho, D.P.: Thyroid Ca^{2+} /NADPH-dependent H_2O_2 generation is partially inhibited by propylthiouracil and methimazole. *Eur J Biochem* (2003) 270; 2363-8
- [23] Florent, M.; Godard, T.; Ballet, J.J.; Gauduchon, P.; Sola, B.: Detection by the comet assay of apoptosis induced in lymphoid cell lines after growth factor deprivation. *Cell Biol Toxicol* (1999) 15; 185-92
- [24] Francesconi, A.; Del Terra, E.; Meli, A.; Ambesi-Impiombato, F.S.: Standardization of the comet assay technique on FRTL5 cells. *Phys Med* (2001) 17 Suppl 1; 232-4
- [25] Frankenberg-Schwager, M.: Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiother Oncol* (1989) 14; 307-20
- [26] Friedberg, E.C.; Aguilera, A.; Gellert, M. et al.: DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst)* (2006) 5; 986-96
- [27] Friesen, C.; Glatting, G.; Koop, B. et al.: Breaking chemoresistance and radioresistance with ^{213}Bi anti-CD45 antibodies in leukemia cells. *Cancer Res* (2007) 67; 1950-8
- [28] Friesen, C.; Lubatschowski, A.; Kotzerke, J.; Buchmann, I.; Reske, S.N.; Debatin, K.M.: Beta-irradiation used for systemic radioimmunotherapy induces apoptosis and activates apoptosis pathways in leukaemia cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2003) 30; 1251-61
- [29] Goddu, S.M.; Howell, R.W.; Bouchet, L.G.; Bolch, W.E.; Rao, D.V.: *MIRD Cellular S. Values*. ed. Reston, VA, 1997

- [30] Gomolka, M.; Rossler, U.; Hornhardt, S.; Walsh, L.; Panzer, W.; Schmid, E.: Measurement of the initial levels of DNA damage in human lymphocytes induced by 29 kV X rays (mammography X rays) relative to 220 kV X rays and gamma rays. *Radiat Res* (2005) 163; 510-9
- [31] Grammaticos, P.C.: Pioneers of nuclear medicine, Madame Curie. *Hell J Nucl Med* (2004) 7; 30-1
- [32] Green, L.M.; Tran, D.T.; Murray, D.K.; Rightnar, S.S.; Todd, S.; Nelson, G.A.: Response of thyroid follicular cells to gamma irradiation compared to proton irradiation: II. The role of connexin 32. *Radiat Res* (2002) 158; 475-85
- [33] Haines, G.A.; Hendry, J.H.; Daniel, C.P.; Morris, I.D.: Increased levels of comet-detected spermatozoa DNA damage following in vivo isotopic- or X-irradiation of spermatogonia. *Mutat Res* (2001) 495; 21-32
- [34] Hengstler, J.G.; Bockisch, A.; Fuchs, J. et al.: Induction of DNA single-strand breaks by ¹³¹I and ^{99m}Tc in human mononuclear blood cells in vitro and extrapolation to the in vivo situation. *Radiat Res* (2000) 153; 512-20
- [35] ICRU, R.: Stopping Powers for Electrons and Positrons.
- [36] Iyer, R.; Lehnert, B.E.: Effects of ionizing radiation in targeted and nontargeted cells. *Arch Biochem Biophys* (2000) 376; 14-25
- [37] Kaighn, M.E.; Lechner, J.F.; Narayan, K.S.; Jones, L.W.: Prostate carcinoma: tissue culture cell lines. *Natl Cancer Inst Monogr* (1978); 17-21
- [38] Kaighn, M.E.; Narayan, K.S.; Ohnuki, Y.; Lechner, J.F.; Jones, L.W.: Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* (1979) 17; 16-23
- [39] Kim, H.; Lee, T.H.; Hwang, Y.S. et al.: Methimazole as an antioxidant and immunomodulator in thyroid cells: mechanisms involving interferon-gamma signaling and H₂O₂ scavenging. *Mol Pharmacol* (2001) 60; 972-80
- [40] Kotzerke, J.; Glatting, G.; Seitz, U. et al.: Radioimmunotherapy for the intensification of conditioning before stem cell transplantation: differences in dosimetry and biokinetics of ¹⁸⁸Re- and ^{99m}Tc-labeled anti-NCA-95 MAbs. *J Nucl Med* (2000) 41; 531-7
- [41] Kumaravel, T.S.; Jha, A.N.: Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat Res* (2006) 605; 7-16
- [42] Leer, L.M.; Cammenga, M.; De Vijlder, J.J.: Methimazole and propylthiouracil increase thyroglobulin gene expression in FRTL-5 cells. *Mol Cell Endocrinol* (1991) 82; R25-30
- [43] McKelvey-Martin, V.J.; Green, M.H.; Schmezer, P.; Pool-Zobel, B.L.; De Meo, M.P.; Collins, A.: The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res* (1993) 288; 47-63

- [44] Moller, P.: The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* (2006) 98; 336-45
- [45] Moller, P.; Knudsen, L.E.; Loft, S.; Wallin, H.: The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2000) 9; 1005-15
- [46] Mould, R.F.: The discovery of radium in 1898 by Maria Sklodowska-Curie (1867-1934) and Pierre Curie (1859-1906) with commentary on their life and times. *Br J Radiol* (1998) 71; 1229-54
- [47] Olive, P.L.: Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat Res* (1989) 117; 79-92
- [48] Olive, P.L.; Banath, J.P.: The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* (2006) 1; 23-9
- [49] Olive, P.L.; Banath, J.P.; Durand, R.E.: Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res* (1990) 122; 86-94
- [50] Olive, P.L.; Durand, R.E.; Jackson, S.M. et al.: The comet assay in clinical practice. *Acta Oncol* (1999) 38; 839-44
- [51] Ostling, O.; Johanson, K.J.: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1984) 123; 291-8
- [52] Pirker, E.: [100 years of roentgen rays. The contribution of Austrian scientists to discovery and applications]. *Wien Klin Wochenschr* (1996) 108; 1-4
- [53] Pitozzi, V.; Pallotta, S.; Balzi, M. et al.: Calibration of the comet assay for the measurement of DNA damage in mammalian cells. *Free Radic Res* (2006) 40; 1149-54
- [54] Prestwich, W.V.; Nunes, J.; Kwok, C.S.: Beta dose point kernels for radionuclides of potential use in radioimmunotherapy. *J Nucl Med* (1989) 30; 1036-46
- [55] Sachs, L., *Angewandte Statistik*, in Springer Verlag Berlin, Berlin, 1999
- [56] Saito, T.; Endo, T.; Kawaguchi, A. et al.: Increased expression of the Na⁺/I⁻ symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* (1997) 82; 3331-6
- [57] Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L.: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* (1988) 175; 184-91
- [58] Slominska, E.M.; Kowalik, K.; Smolenski, R.T. et al.: Accumulation of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* (2006) 21; 800-6

- [59] Soldin, O.P.; Braverman, L.E.; Lamm, S.H.: Perchlorate clinical pharmacology and human health: a review. *Ther Drug Monit* (2001) 23; 316-31
- [60] Speit, G.; Hartmann, A.: The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* (2006) 314; 275-86
- [61] Speit, G.; Trenz, K.; Schutz, P.; Rothfuss, A.; Merk, O.: The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. *Toxicol Lett* (1999) 110; 73-8
- [62] Spitzweg, C.: [The sodium-iodide symporter. Pathophysiologic, diagnostic and therapeutic significance]. *Internist (Berl)* (2003) 44; 396-402, 404-8, 410-1
- [63] Spitzweg, C.; Joba, W.; Morris, J.C.; Heufelder, A.E.: Regulation of sodium iodide symporter gene expression in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid* (1999) 9; 821-30
- [64] Sur, P.K.: Discovery of X-ray and its consequences. *J Indian Med Assoc* (1995) 93; 415-6
- [65] Van Sande, J.; Massart, C.; Beauwens, R. et al.: Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology* (2003) 144; 247-52
- [66] Ward, J.F.: DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* (1988) 35; 95-125
- [67] Wardman, P.: Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* (2007) 19; 397-417
- [68] Weetman, A.P.; Holt, M.E.; Campbell, A.K.; Hall, R.; McGregor, A.M.: Methimazole and generation of oxygen radicals by monocytes: potential role in immunosuppression. *Br Med J (Clin Res Ed)* (1984) 288; 518-20
- [69] Weetman, A.P.; McGregor, A.M.; Hall, R.: Methimazole inhibits thyroid autoantibody production by an action on accessory cells. *Clin Immunol Immunopathol* (1983) 28; 39-45
- [70] Weiss, S.J.; Philp, N.J.; Grollman, E.F.: Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid. *Endocrinology* (1984) 114; 1090-8
- [71] Whitaker, S.J.; Powell, S.N.; McMillan, T.J.: Molecular assays of radiation-induced DNA damage. *Eur J Cancer* (1991) 27; 922-8
- [72] Wollin, M.; FitzGerald, T.J.; Santucci, M.A. et al.: Radiosensitivity of human prostate cancer and malignant melanoma cell lines. *Radiother Oncol* (1989) 15; 285-93
- [73] Zheng, H.; Olive, P.L.: Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice. *Int J Radiat Biol* (1997) 71; 275-82

7. Anhang

7.1. Reagenzien

Accutase	PAA Laboratories GmbH Cölbe, Deutschland
Agarose low melting point	Biozym Scientific GmbH Oldendorf, Deutschland
Agarose NEEO Ultra Qualität	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Aqua ad injectabilia	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
DMSO	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	Mallincrodt Baker D.V. Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland
HCl 37 %	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
5-Iodo-2-Deoxyuridin min. 99 %	Sigma-Aldrich GmbH Deisendorf, Deutschland
Methimazol min. 98 %	Sigma-Aldrich GmbH Deisendorf, Deutschland
NaCl	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
NaOH M 40,01	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland
NaOH Plätzchen	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Na ₂ EDTA	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Natriumperchlorat	Bayer Vital Leverkusen, Deutschland
Nicotinamid	Sigma-Aldrich GmbH Deisendorf, Deutschland
PBS (Ca ²⁺ und Mg ²⁺ frei)	Biochrom KG Heidelberg, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
Trypsin-EDTA	Biochrom KG Heidelberg, Deutschland

7.2. Geräte und sonstige Materialien

Objektträger mit Mattrand	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co.KG Braunschweig, Deutschland
Deckgläser 24 x 60 mm # 1	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co.KG Braunschweig, Deutschland
Electrophoresis power suply EPS 500/400	Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Schweden
Electrophoresis power supply EV231	Consort, Turnhout, Belgien
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Subcell GT Sytem Hercules, CA USA
Mikroskop	Axioskop 40 FL Carl Zeiss MicroImaging GmbH Jena, Deutschland
Elektronisches Vorschaltgerät für HBO 100 W/DC	ebq 100 isolated Licht und Mehr Leistungselektronik Jena GmbH Jena, Deutschland
Kamera	COHU high performance CCD Camera Bfi Optilas Puchheim, Deutschland
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Glaspipetten	Falcon Becton Dickinson Labware Franklin Lakes, USA
Pipettierhilfe Accujet	Eppendorf Hamburg, Deutschland
PP-Test Tubes 25/50 ml	Greiner bio-one Cellstar Frickenhausen, Deutschland
Sterilfilter Millex ^R -GS 0,22 µm	Millipore Carrigtwohill, Irland
Casy Cell Counter + Analysis System	Model TT Schärfe System Reutlingen, Deutschland
Casyton	Model TT Schärfe System Reutlingen, Deutschland

Zellkulturflaschen 75 cm ²	Nunc Nunc VWR International GmbH
Mikrotiterplatten	Multidish-6-Well Nunc VWR International GmbH
Brutschrank	APT-Line CB Binder Tuttlingen, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius Basic Göttingen, Deutschland
Elumatic III Technetium-Generator (99Mo/99mTc)	CIS biointernational Schering Berlin, Deutschland
188W-188Re Radionuclid Generator	Polatom Otwock-Swierk, Polen
pH-Meter	Schott-Instruments GmbH Mainz, Deutschland
Konduktometer LF 197	WTW-GmbH Melsungen, Deutschland
Gamma-Counter	Cobra TM II Autogamma Packard [®] A Canberra Company, Australien

7.3. Tabellen zum Uptake

7.3.1. Uptake ²¹¹At

Probenart	cpm	%	cpm	%	cpm	%	MW %
Ausgangsaktivität	1994611		1377495		1245704		1539270
Zellpellett 4°	102365	5,13	33537	2,43	43872	3,52	3,70
Zellpellett 37°	213413	10,70	116723	8,47	81321	6,53	8,57
Zellpellett Perchlorat 4°	37068	1,86	16830	1,22	43268	3,47	2,18
Zellpellett Perchlorat 37°	8411	0,42	9244	0,67	5179	0,42	0,50

7.3.2. Uptake ^{99m}Tc

Probenart	cpm	%	cpm	%	cpm	%	MW %
Ausgangsaktivität	3092020		1612426,5		1654094,5		2119513,5
Zellpellett 4°	47980	1,55	30252,67	1,88	55629,33	3,36	2,26
Zellpellett 37°	391931	12,68	232247,67	14,40	218557,33	13,21	13,43
Zellpellett Methimazol 4°	15767	1	7444	0,46	10903,33	0,66	0,54
Zellpellett Methimazol 37°	403259	13	110116	6,83	129765,67	7,85	9,24
Zellpellett Perchlorat 4°	1832	0,06	1730,67	0,11	1257,00	0,08	0,08
Zellpellett Perchlorat 37°	1383	0,04	3627,00	0,22	2471,33	0,15	0,14

7.3.3. Uptake ^{131}Iod

Probenart	cpm	%	cpm	%	cpm	%	MW %
Ausgangsaktivität	716906		1401482		1408640		1175676
Zellpellett 4°	1832	0,26	10679	0,76	4484	0,32	0,45
Zellpellett 37°	43537	6,07	101011	7,21	58705	4,17	5,82
Zellpellett Methimazol 4°	819	0,11	2289	0,16	456	0,04	0,09
Zellpellett Methimazol 37°	17409	2,43	55835	3,98	20164	1,73	2,14
Zellpellett Perchlorat 4°	443	0,06	1773	0,13	722	0,05	0,08
Zellpellett Perchlorat 37°	399	0,06	817	0,06	533	0,04	0,05

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur an der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Kotzerke angefertigt habe.

Die Arbeit wurde in dieser oder ähnlicher Form an keiner anderen Stelle zum Zwecke eines Promotions- oder anderen Prüfungsverfahrens eingereicht.

Cindy Kahmann

Dresden, den 20.12.2007

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Kotzerke für die Vergabe und gute Betreuung der Arbeit bedanken.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. rer. nat. Wunderlich für die Betreuung der Arbeit im Labor.

Frau Runge danke ich für alle guten Ratschläge und die Einarbeitung im Labor.

Robert Freudenberg möchte ich für die Hilfe bei den Berechnungen zur Dosimetrie danken.

Mein Dank gilt auch Maria Wendisch für die Unterstützung im Labor und ausdauerndes Korrekturlesen dieser Arbeit.

Frau Oehme und Herrn Andreeff danke ich für die Hilfe bei statistischen Fragestellungen.

Lothar Meyer möchte ich für die Hilfe bei der Umsetzung der Zeichnungen ganz herzlich danken.

Thesen

1. Der Comet Assay ist eine für die Erfassung der Wirksamkeit von Strahlenmodulatoren geeignete Methode.
2. ^{188}Re -Perrhenat verursacht als Betastrahler DNA-Schäden, welche mit dem Comet Assay detektiert werden können. Je höher die Dosis, desto höher das Schadensausmaß.
3. Externe Röntgenbestrahlung und offene Betastrahler haben zellspezifische, unterschiedliche intrinsische Wirkung.
4. Bei 37°C laufen Reparaturprozesse ab, die dem Signal der DNA-Schädigung entgegenwirken. Die Bestimmung der Reparaturprozesse gestaltet sich beim vorliegenden biologischen System schwierig, da keine exakten Nullwerte (max. DNA-Schädigung) aufgrund der langen Verarbeitungszeit gewonnen werden können.
5. Das biologischen Systeme FRTL5 weist für unterschiedliche Strahlenqualitäten (Röntgenstrahlung und Betastrahlung) die gleiche Strahlenempfindlichkeiten auf.
6. Das biologische System PC3 weist für beide Strahlenqualitäten unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit auf.
7. Perchlorat ist ein kompetitiver Hemmstoff am NIS, unter ^{188}Re -Bestrahlung bewirkt es eine Radioprotektion von FRTL5 bei 4°C und 37°C .
8. Perchlorat zeigt auch unter Röntgenbestrahlung eine protektive Wirkung auf beide Zellsysteme. Eine unspezifische Protektion kann hierbei angenommen werden.
9. Methimazol protektiert sowohl FRTL5 als auch PC3 unter Röntgen- und ^{188}Re -Bestrahlung. Dies beruht mutmaßlich auf dessen Scavenger-Eigenschaften. Unter 37°C -Bedingungen war der Einfluss deutlicher als unter 4°C -Bedingungen.
10. Methimazol reduziert die Aufnahme von Radionukliden in FRTL5, sodass eine Interaktion am NIS vermutet wird.
11. Nicotinamid wirkt unter normoxischen Bedingungen nicht strahlensensibilisierend.