

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin  
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Jörg Kotzerke

---

# **Einfluss der Strahlenqualität auf die Adaptive Antwort nach Bestrahlung von Schilddrüsenzellen mit offenen Radionukliden und externer Bestrahlung**

## **DISSERTATIONSSCHRIFT**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus

der Technischen Universität Dresden

von

Susanne Schweitzer

aus Dresden

Dresden 2017

1. Gutachter: Herr PD Dr. med. K. Zöphel

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Dr. med. A. Bockisch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.09.2017

gez.: Herr Prof. Dr. med. J. Gräßler  
Stellv. Vorsitzender der Promotionskommission

# Inhaltsverzeichnis

<b>Verzeichnis der Abkürzungen .....</b>	<b>v</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Material und Methode.....</b>	<b>3</b>
2.1 Material .....	3
2.1.1 Zellkultur .....	3
2.1.2 Bestrahlungsmodalitäten.....	4
2.2 Methode .....	6
2.2.1 Messung der intrazellulären Radionuklidaufnahme (Uptake).....	6
2.2.2 Inhibition der intrazellulären Radionuklidaufnahme .....	6
2.2.3 Koloniebildungstest .....	7
2.2.4 Experimentelles Design.....	8
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>15</b>
3.1 Dosis-Wirkungsbeziehung bei FRTL-5 Zellen.....	15
3.1.1 Klonogenes Überleben nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung.....	15
3.1.2 Klonogenes Überleben nach Bestrahlung mit $^{99m}\text{Tc} \pm$ Perchlorat .....	16
3.2 Nachweis der Adaptiven Antwort bei externer Bestrahlung mit der Röntgenröhre .....	18
3.2.1 Abhängigkeit der Adaptiven Antwort von der Vorbestrahlungsdosis zu verschiedenen Erholungszeiten .....	19
3.2.2 Abhängigkeit der Adaptiven Antwort von der Erholungszeit .....	21
3.3 Nachweis der Adaptiven Antwort bei extrazellulärer Bestrahlung mit $^{99m}\text{Tc}$ und Perchlorat-Vorinkubation .....	22
3.3.1 Abhängigkeit der Adaptiven Antwort von der Vorbestrahlungsdosis nach 6 h Erholungszeit.....	22
3.3.2 Abhängigkeit der Adaptiven Antwort von der Erholungszeit .....	24
3.4 Nachweis der Adaptiven Antwort bei Bestrahlung mit $^{99m}\text{Tc}$ .....	25
3.4.1 Abhängigkeit der Adaptiven Antwort von der Vorbestrahlungsdosis nach 6 h Erholungszeit.....	26
3.4.2 Abhängigkeit der Adaptiven Antwort von der Erholungszeit .....	27

3.5	Nachweis der Adaptiven Antwort bei Kombination der Strahlenqualitäten .....	28
3.5.1	Nachweis der Adaptiven Antwort bei Vorbestrahlung mit Röntgenstrahlung und Nachbestrahlung mit $^{99m}\text{Tc}$ .....	29
3.5.2	Nachweis der Adaptiven Antwort bei Vorbestrahlung mit Röntgenstrahlung und Nachbestrahlung mit $^{99m}\text{Tc}$ und Perchlorat .....	31
3.5.3	Nachweis der Adaptiven Antwort bei Vorbestrahlung mit $^{99m}\text{Tc}$ und Nachbestrahlung mit der Röntgenstrahlung .....	33
3.5.4	Nachweis der Adaptiven Antwort bei Vorbestrahlung mit $^{99m}\text{Tc}$ und Perchlorat und Nachbestrahlung mit Röntgenstrahlung.....	35
3.6	Einfluss der Vorbestrahlung durch Röntgen auf den Uptake von $^{99m}\text{Tc}$ nach 4 h; 6 h; 24 h Erholungszeit .....	37
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>40</b>
4.1	Dosis-Wirkungsbeziehungen bei Bestrahlung von FRTL-5 Zellen .....	41
4.1.1	Klonogenes Überleben nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung.....	41
4.1.2	Klonogenes Überleben nach Bestrahlung mit $^{99m}\text{Tc} \pm$ Perchlorat .....	42
4.1.3	Vergleich der Strahlenqualitäten .....	42
4.2	Untersuchung der Adaptiven Antwort .....	43
4.2.1	Biologische Systeme.....	43
4.2.2	Biologischer Endpunkt .....	44
4.2.3	Einfluss der Vorbestrahlungsdosis auf die Adaptive Antwort .....	44
4.2.4	Einfluss der Erholungszeit auf die Adaptive Antwort.....	45
4.2.5	Einfluss der Strahlenqualität auf die Adaptive Antwort .....	45
4.3	Variation unterschiedlicher Strahlenqualitäten .....	46
4.4	Einfluss der Vorbestrahlung durch Röntgen auf den Uptake von $^{99m}\text{Tc}$ .....	47
4.5	Die Adaptive Antwort als Reaktion auf Zellstress.....	48
4.6	Einordnung der Adaptiven Antwort zu anderen Niedrig-Dosis-Effekten .....	49
4.7	Mechanismen der Adaptiven Antwort .....	50
4.8	Bedeutung der Adaptiven Antwort .....	51
4.9	Die Adaptive Antwort in der Medizin .....	52
4.10	Ausblick.....	53
4.11	Limitationen .....	54

---

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>70</b>
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	70
8.2	Tabellenverzeichnis.....	73
8.3	Materialien.....	74
8.3.1	Reagenzien.....	74
8.3.2	Zelllinie.....	75
8.3.3	Strahlenqualitäten .....	75
8.3.4	Geräte und sonstige Materialien.....	75
	<b>Anlage 1: Erklärung zur Eröffnung des Promotionsverfahrens</b> .....	<b>77</b>
	<b>Anlage 2</b> .....	<b>78</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>79</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BSA	Bovin serum albumin
CIERT	Combination of internal and external radiotherapy
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSB	Doppelstrangbruch
DNA	Deoxyribonucleic acid- Desoxyribonukleinsäure
ESB	Einzelstrangbruch
FRTL-5	Fisher rat thyrocyte cell line no. 5
FKS	Fetales Kälberserum
HRS	Low-dose Hypersensitivity
KF	Kulturflasche
LET	Linearer Energietransfer
LNT-Modell	Linear-No-Threshold-Modell
LQM	Linearquadratisches Modell
MAP	Mitogen-activated protein
MIRD	Medical Internal Radiation Dose
MTP	Mikrotiterplatte
NIS	Natrium-Iodid Symporter
PBS	Phosphate buffered saline
PCI	Perchlorat
PE	Plattiereffizienz
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

SF	Surviving fraction
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thyreoidale Peroxidase
TSH	Thyreoida-stimulierendes Hormon
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UDS	Unscheduled DNA synthesis
ÜF	Überlebensfraktion
WST	Water soluble tetrazolium

# 1 Einleitung

In der Medizin werden die Eigenschaften ionisierender Strahlung in der Diagnostik und in der Therapie vielseitig genutzt. Hierbei kommen externe Strahlungsquellen wie Röntgenstrahlung sowie offene Radionuklide zum Einsatz. In der nuklearmedizinischen Diagnostik wird hauptsächlich der  $\gamma$ -Strahler  $^{99m}\text{Tc}$  eingesetzt. Für die therapeutischen Anwendungen stehen die  $\beta$ -Strahler  $^{131}\text{I}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{90}\text{Y}$  und  $^{177}\text{Lu}$  zur Verfügung.

Die Strahlenbiologie untersucht die Wirkung ionisierender Strahlen auf Zellen und biologische Systeme. Die DNA der Zelle gilt als das für das Zellüberleben entscheidende strahlenempfindliche Target. Das Ausmaß der Strahlenschäden wird von der Art der Strahlung, der absorbierten Dosis und dem Linearen Energietransfer (LET) bestimmt. Die Höhe des LET ist entscheidend für das Ausmaß der biologischen Schäden (Pouget and Mather, 2001). Maßgebend für das Zellüberleben sind außerdem die Strahlenempfindlichkeit der Zellen, die vorhandenen Reparaturmechanismen und der Zellzyklus.

Bei den Untersuchungen der Strahlenwirkungen nehmen Niedrig-Dosis-Effekte eine besondere Rolle ein. Zu diesen Effekten gehören unter anderem die Adaptive Antwort, die induzierte Radioresistenz, die Low-dose Hypersensitivity, der Bystander Effekt und die Hormesis. Die Erforschung dieser Effekte soll klären, welchen Einfluss diese auf diagnostische oder therapeutische Behandlungen in der Medizin haben könnten. Mit der zunehmend an Bedeutung gewinnenden Radionuklidtherapie müssen mögliche nützliche Effekte und unerwünschte Nebenwirkungen genauer untersucht werden.

Im Mittelpunkt des Interesses dieser Arbeit steht die Adaptive Antwort. Dieser 1984 durch Olivieri erstmals untersuchte Effekt (Olivieri, et al., 1984) beschreibt, dass Zellen durch eine niedrig dosierte Vorbestrahlung in einem begrenzten Zeitraum resistenter gegenüber einer zweiten hochdosierten Bestrahlung sind, als unvorbehandelte Zellen. Dieser Effekt konnte bereits für verschiedene biologische Endpunkte (Genmutation, Chromosomenschaden, DNA-Schaden, Zellüberleben) sowohl in vivo als auch in vitro nachgewiesen werden (Cai, 1999; Choi, et al., 2010). Als wesentliche Einflussfaktoren auf die Ausbildung der Adaptiven Antwort gelten die Dosisrate, die Vorbestrahlungsdosis und die Erholungszeit zwischen den Bestrahlungen. Der adaptive Effekt kann ebenso durch Exposition mit chemischen Noxen oder UV-Strahlung hervorgerufen werden (Mohankumar, et al., 2000; Vares, et al., 2011; Choi, et al., 2013). Die Mechanismen der Adaptiven Antwort konnten noch nicht abschließend geklärt werden. Diskutiert werden eine schnellere DNA-Reparatur, die verbesserte Abwehr von oxidativem Stress, die vermehrte Bildung anti-apoptotischer Proteine und die An-



passung des Zellzyklus. Die Adaptive Antwort wird als Teil einer allgemeinen Stressantwort der Zelle auf verschiedene Noxen angesehen (Calabrese et al., 2007).

Während eine Vielzahl von Studien zur Adaptiven Antwort für externe Röntgen- und Gammastrahlung vorliegt (Gajendiran, et al., 2001; Stoilov, et al., 2007; Kilemade, et al., 2008), ist die Adaptive Antwort nach Bestrahlung mit offenen Radionukliden noch nicht umfassend untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Adaptive Antwort mit Röntgenstrahlung und mit dem Radionuklid  $^{99m}\text{Tc}$  nachzuweisen. Dabei soll das Auslösen einer Adaptiven Antwort bei Kombination identischer und verschiedener Strahlenqualitäten für Vor- und Nachbestrahlung analysiert werden.

Weiterhin sollen die Erholungszeit zwischen den Bestrahlungen und die Vorbestrahlungsdosis variiert werden, um deren Einfluss auf die Adaptive Antwort der FRTL-5 Zellen zu testen.

Im Hinblick auf den klinischen Alltag soll diese Arbeit einen Anhaltspunkt liefern, inwiefern Vorbestrahlungen z. B. in der Diagnostik einen Einfluss auf nachfolgende hochdosierte Bestrahlungen in der Therapie haben. Die Ergebnisse könnten im Kontext einer Kombination von interner und externer Radiotherapie (CIERT) in modernen Ansätzen der Tumorbehandlung bedeutsam sein (Kotzerke and Oehme, 2010; Dietrich, et al., 2015).

## 2 Material und Methode

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellkultur

Die Experimente wurden mit der Zelllinie FRTL-5 durchgeführt. FRTL-5 Zellen sind adhärent wachsende Rattenschilddrüsenzellen epithelialen Ursprungs (Mulcahy, et al., 1985). In einem Kulturmedium ohne TSH wachsen sie als Monolayer, so dass sie den Boden einer MTP vollständig bedecken (Mulcahy, et al., 1985). Die Zellen verfügen über einen Natrium-Iodid Symporter (NIS) und sind thyreoidale Peroxidase (TPO) positiv.

Der NIS ist für den Iodidtransport in die Zelle verantwortlich. Angetrieben durch einen Natrium-Gradienten, der durch die membranständige  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufrechterhalten wird, transportiert er jeweils zwei Natriumionen und ein Iodidion ins Zellinnere. Der NIS ist nicht substanzspezifisch, sodass auch andere einwertige Anionen wie z.B.  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ,  $^{188}\text{ReO}_4^-$ ,  $^{211}\text{At}^-$  (Carlin, et al., 2002; Lundh, et al., 2009),  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Br}^-$  (Spitzweg, 2003) usw. mit unterschiedlicher Selektivität transportiert werden können (Van Sande, et al., 2003). Hemmbar ist der Transportweg durch kompetitive Inhibitoren wie Perchlorat und Thiocyanat oder den  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Inhibitor Ouabain (Dohan and Carrasco, 2003). Die Regulation erfolgt über verschiedene bekannte Signaltransduktionswege und Cytokine (Dohan, et al., 2003). Das membranständige Glykoprotein (70-90kDa) besitzt 13 Transmembrandomänen und gehört zur Klasse der solute carrier family 5 (SCL5) (Dohan and Carrasco, 2003).

##### 2.1.1.1 Zellkultivierung

Die Zellen wurden in Gibco F12 Medium mit 6 Hormonen und FKS bei 37 °C in 5 %  $\text{CO}_2$  Atmosphäre kultiviert. In der exponentiellen Wachstumsphase beträgt die Verdopplungszeit unter diesen Kultivierungsbedingungen 30-40 h. Zum Splitten wurden die konfluenten Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und danach mit 3 ml Accutase für 10 min bei 37 °C abgelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde mit 7 ml Kulturmedium in eine Falconflasche überführt und 5 min bei 500 g zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde mit 10 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellen wurden auf neue Kulturflaschen bzw. für Versuche auf 6-Well-MTP-Platten verteilt. Die verwendeten Zellen wurden vor Beginn der Arbeit bei möglichst niedriger Passage vermehrt und eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen für maximal 10 Passagen verwendet.

##### 2.1.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellkulturen

Um bei allen Experimenten auf die gleichen Zellpassagen zurückgreifen zu können, wurden die Zellen kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen wie bei der Zellkultur abgelöst und zentrifugiert. Daraufhin wurde die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und etwa

$10 \cdot 10^6$  Zellen in 1 ml Kulturmedium und 1 ml Kryomedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde sofort in eine vorgekühlte Nalgene-Box gestellt und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  über 24 h eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei  $-179\text{ }^\circ\text{C}$ .

Für Versuche wurden die FRTL-5 Zellen im Wasserbad ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ ) im Kryoröhrchen aufgetaut. Es folgte die Überführung der Zellsuspension in ein 50 ml Falconröhrchen und die tropfenweise Zugabe von Kulturmedium. Nach der Zentrifugation bei 280 g über 5 min wurde das Kryomedium abpipettiert und das Zellpellet im warmen Kulturmedium resuspendiert. Für die weitere Zellkultur wurden die Zellen in Zellkulturflaschen überführt.

### 2.1.1.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzählung erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer. Dazu wurde die Zellsuspension mit Trypanblau vermischt, welches die toten Zellen, im Gegensatz zu den vitalen Zellen, blau verfärbt. Nach dem Auftragen auf die Zellkammer wurden 4 Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \left( \frac{\text{gezählte Zellen}}{4} \right) \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4$$

Zur Abschätzung der Vitalität wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Vitalität (\%)} = \left( \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte} + \text{gefärbte Zellen}} \right) \cdot x \cdot 100$$

Bei allen durchgeführten Versuchen war die Zellvitalität größer als 95 %.

## 2.1.2 Bestrahlungsmodalitäten

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte entweder mit der Röntgenröhre als externe Strahlenquelle, oder mit dem Radionuklid  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  wird über den NIS in die Zelle aufgenommen. Die Radionuklidaufnahme kann kompetitiv mit Perchlorat ( $\text{ClO}_4^-$ ) gehemmt werden. Somit konnte sowohl ein intrazellulärer als auch extrazellulärer Bestrahlungsmodus durchgeführt werden. In allen Versuchen wurden 24 h vor der Bestrahlung je 0,25 Mio. Zellen pro Well einer 6-Well-MTP ausgesät und die Bestrahlung erfolgte in einem Volumen von 2 ml.

### 2.1.2.1 Bestrahlung mit der Röntgenröhre

Für die Versuche konnte die Röntgenröhre des OncoRay (Zentrum für Innovationskompetenz, Medizinische Fakultät, TU Dresden) genutzt werden. Bei einem Röhrenstrom von  $I=20\text{ mA}$  und einer Beschleunigungsspannung von  $U=200\text{ kV}$  betrug die Dosisleistung  $DL=1,235\text{ Gy/min}$ . In Tab. 1 ist die Variation der Dosisleistung durch Veränderung des Röhrenstroms dargestellt, die geringere Dosisleistung wurde für kleine Bestrahlungsdosen verwendet.

Tab. 1: Variation der Dosisleistung an der Röntgenröhre

Röhrenstrom	Dosisleistung
20 mA	1,235 Gy/min
2 mA	0,1235 Gy/min

### 2.1.2.2 Bestrahlung mit $^{99m}\text{Tc}$

$^{99m}\text{Tc}$  ist aufgrund seiner Halbwertszeit von 6,02 h und der niedrigen Gammaenergie von 140 keV das am häufigsten genutzte Nuklid in der nuklearmedizinischen Diagnostik. Es wird in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin am Universitätsklinikum Dresden aus einem  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Generator (UltraTechnekow FM, Covidien Deutschland GmbH, Neustadt, Deutschland) gewonnen. Dazu wird es mit 0,9 %iger NaCl Lösung aus einer mit  $^{99}\text{Mo}$  adsorbierten Aluminiumoxid-Säule als Pertechnetat  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  eluiert.  $^{99m}\text{Tc}$  ist das metastabile Isomer des  $^{99}\text{Tc}$ . Der lineare Energietransfer (LET) in Wasser beträgt 1 keV/ $\mu\text{m}$ . Seine emittierte Strahlung besitzt eine Gesamtenergie von 142,646 keV, wobei 89 % der Energie monoenergetischen Gammaquanten entspricht. Beim inneren Konversionsprozess werden zusätzlich Auger- und Konversionselektronen emittiert. Die Auger-Elektronen besitzen einen niedrigen Anteil an der Gesamtenergie (0,63 %) und eine geringe Reichweite von nur 1-10 nm (Howell, 1992). Durch den hohen LET von 10-15 keV/ $\mu\text{m}$  können sie in Zellkernnähe DNA-Doppelstrangbrüche induzieren. Pro Zerfall werden 5 Auger-Elektronen emittiert.

### 2.1.2.3 Dosimetrie und Bestrahlungsbedingungen

Zum Vergleich der Bestrahlungsmodalitäten muss für  $^{99m}\text{Tc}$  die intra- und extrazelluläre Dosis berechnet werden. Die Dosis (D) entspricht der absorbierten Energie (E) pro Masse (m) und wird in Joule pro Kilogramm (J/kg) oder Gray (Gy) angegeben:

$$D = \frac{dE}{dm}$$

Um die extrazelluläre Dosis berechnen zu können, mussten die geometrischen Rahmenbedingungen einbezogen werden. Die Bestrahlung erfolgte in 2 ml Aktivitätslösung pro Vertiefung einer 6-Well-MTP. Dies entsprach einer Füllhöhe von 2,1 mm bei einem Welldurchmesser von 31 mm. Alle Bestrahlungen mit  $^{99m}\text{Tc}$  wurden über eine Stunde durchgeführt. Die Dosiskalkulation erfolgte mithilfe des MIRD-Kugelmodells (Bolch, et al., 2009; Freudenberg, et al., 2014). Da die Zellen sich während der Bestrahlung am Boden der MTP befanden und somit keine sphärische Aktivitätsverteilung vorlag, musste mit der halben Kugeldosis gerechnet werden. Um eine extrazelluläre Dosis von 1 Gy durch einstündige Bestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  und Perchlorat zu erreichen, wurde eine Aktivität von 500 MBq appliziert. Ohne kompetitive Hemmung des NIS durch Perchlorat wurde  $^{99m}\text{Tc}$  in die Zelle aufgenommen, wodurch

sich bei gleicher Aktivitätskonzentration eine viel höhere intrazelluläre Dosis ergab. Bei einem durchschnittlichen Uptake von 2,5 % entsprach bereits eine Aktivitätszugabe von 5 MBq einer Dosis von 1 Gy.

## 2.2 Methode

### 2.2.1 Messung der intrazellulären Radionuklidaufnahme (Uptake)

Sowohl für die Berechnung der intrazellulären Dosis, als auch zur Beurteilung der Radiotoxizität ist die Messung der intrazellulären Aufnahme von  $^{99m}\text{Tc}$  über den NIS notwendig. Diese ist als Verhältnis von intrazellulär aufgenommenem  $^{99m}\text{Tc}$  zu zugegebenem  $^{99m}\text{Tc}$  definiert und wird im Folgenden als Uptake bezeichnet.

Versuchsvorbereitung:

Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden jeweils 0,25 Mio. FRTL-5 Zellen pro Well auf 6-Well-MTP verteilt, und für 24 h zur Inkubation in den Brutschrank gestellt.

Durchführung:

Am Versuchstag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und pro Well die Traceraktivität von 100 kBq  $^{99m}\text{Tc}$  zugegeben. Die Bestrahlungsdauer betrug wie in allen anderen Versuchen eine Stunde. Nach Ablauf der Zeit wurden die 6-Well-MTP mit Eis gekühlt und das Kulturmedium mit der Aktivität abgenommen. Jedes Well wurde zweimal für 2 min mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 0,5 ml Accutase pro Well für 10 min im Brutschrank inkubiert, und mit 0,5 ml Kulturmedium resuspendiert. Im Gammacounter wurde die Aktivität des Überstandes, der Waschlösungen und der Zellsuspension jeweils getrennt gemessen, wobei gleichzeitig eine Halbwertszeitkorrelation erfolgte. Der prozentuale Uptake wurde aus dem Verhältnis von Aktivität in der Zellsuspension zur Gesamtaktivität berechnet. Da gleichzeitig eine Zellzählung und eine Proteinbestimmung erfolgte, konnte der Uptake auch auf diese Größen bezogen werden.

### 2.2.2 Inhibition der intrazellulären Radionuklidaufnahme

Wie bereits in Kapitel 2.1.1 erwähnt wurde, ist Perchlorat ein kompetitiver Inhibitor des NIS und hemmt die Aufnahme von  $^{99m}\text{Tc}$  in die Zelle. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass bereits bei einer Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Perchlorat (16 mM  $\text{NaClO}_4$ ) pro Well die  $^{99m}\text{Tc}$  Aufnahme nahezu vollständig (<0,15 %) blockiert wird. Auf diesem Weg können FRTL-5 Zellen auch mit  $^{99m}\text{Tc}$  extrazellulär bestrahlt werden. Bei den Koloniebildungsversuchen zeigten sich keine zytotoxischen Effekte des Perchlorats.

Durchführung:

Nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen mit 50 µl Perchlorat pro Well für 15 min im Brutschrank inkubiert. Es folgte die Zugabe der Aktivität und, wie in 2.2.1 beschrieben, die Bestimmung des Uptakes.

### **2.2.3 Koloniebildungstest**

Der Koloniebildungstest ist eine häufig angewandte Standardmethode in der Strahlenbiologie. Sie eignet sich zur Bestimmung des Langzeitüberlebens und somit des Ausmaßes der intrinsischen Strahlenwirkung. Eine Bestrahlung kann verschiedene Reaktionen in der Zelle hervorrufen. Sind die DNA-Reparatur-Mechanismen erfolgreich, überlebt die Zelle. Ist der DNA-Schaden dagegen zu hoch oder kommt es zu einer fehlerhaften Reparatur, folgen Mutationen (ggf. onkogen) oder der Zelltod. Bei dem Test wird in vitro untersucht, ob eine Einzelzelle nach der Bestrahlung weiterhin die Fähigkeit zur Integrität und Reproduktion besitzt und so zu einer Kolonie mit über 50 Zellen heranwachsen kann. Diese Fähigkeit wird als klonogenes Überleben bezeichnet.

Versuchsvorbereitung:

Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden je 0,25 Mio. FRTL-5 Zellen pro Well auf 6-Well-MTP ausgesät.

Durchführung:

Nach dem Mediumwechsel wurden entsprechende Proben mit je 50 µl Perchlorat pro Well für 15 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es folgte die Aktivitätszugabe und die Bestrahlung über eine Stunde. Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium abgenommen und jedes Well dreimal für 2 min mit warmen PBS gespült. Die Zellen wurden abgelöst und in kleine Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellzahl jedes Falcons wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt, und die jeweiligen Volumina für die gewünschte Zellzahl wurden berechnet. Die entsprechende Menge Zellsuspension wurde mit 5 ml Kulturmedium in eine kleine Kulturflasche überführt und für 13 Tage im Brutschrank inkubiert. Hierbei wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, sodass aus einem bestrahlten Well je 3 kleine Kulturflaschen ausgesät wurden.

Zur Färbung wurde das Kulturmedium verworfen und die Flaschen zweimal mit 3 ml PBS gewaschen. Es folgte die Fixierung mit 2 ml 80 % Ethanol für 10 min. Nach Abnahme des Alkohols wurden die Kolonien für 30 min mit 3 ml Kristallviolett (2,3 %) gefärbt. Anschließend wurden die Flaschen mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet.

Die Zählung der gewachsenen Kolonien pro Kulturflasche (KF) erfolgte mikroskopisch mit einem 2,5er Objektiv. Eine Kolonie wurde ab 50 Zellen pro Zellhaufen gezählt. Aus der be-

stimmt Anzahl von Kolonien wurden zur Auswertung die Plattiereffizienz (PE) und die Überlebensfraktion (ÜF) wie folgt berechnet:

$$\text{PE (\%)} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien pro KF}}{\text{Anzahl der verteilten Zellen pro KF}} * 100$$

$$\text{ÜF (Dosis x)} = \frac{\text{PE (Dosis x)}}{\text{PE (0 Gy)}}$$

Alle Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen wiederholt, und jeweils mit Dreifachbestimmungen durchgeführt.

#### **2.2.4 Experimentelles Design**

Zur Charakterisierung der FRTL-5 Zelllinie wurde zunächst die Wirkung von Strahlung auf das Zellüberleben untersucht. Mit Hilfe des Koloniebildungstests wurden Dosis-Wirkungskurven nach Bestrahlung durch die Röntgenröhre und durch das offene Radionuklid  $^{99m}\text{Tc}$  angefertigt. Dabei wurden immer sowohl unbestrahlte Proben, als auch Proben mit und ohne Perchlorat angefertigt. Durch Auswertung der erhaltenen Kurven konnten die Dosispunkte für die weitere Versuchsplanung ermittelt werden.

##### **2.2.4.1 Erstellen von Dosiswirkungskurven**

Zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurven wurden die FRTL-5 Zellen entsprechend dem vorgesehenen Protokoll am Vortag auf 6-Well-MTP verteilt. Nach dem Mediumwechsel erfolgte die 15 minütige Inkubation mit Perchlorat. Bei der Röntgenbestrahlung wurden die Proben bei einer Stromstärke von 20 mA und einer Dosisleistung von 1,235 Gy/min für 50 s in der Röntgenröhre bestrahlt um 1 Gy zu erreichen. Um die Dosen von 0,05 Gy bis 10 Gy zu erreichen wurde die Bestrahlungszeit, wie in Tab. 2 dargestellt, variiert.

Tab. 2: Variation der Bestrahlungszeiten an der Röntgenröhre (Stromstärke: 20 mA, Dosisleistung: 1,235 Gy/min)

Dosis	Bestrahlungszeit
0,05 Gy	4 s
0,5 Gy	26 s
1 Gy	50 s
2 Gy	1 min 39 s
5 Gy	4 min 5 s
7,5 Gy	6 min 6 s
10 Gy	8 min 7 s

Bei Erstellung der Dosis-Wirkungskurven für  $^{99m}\text{Tc}$  wurden Aktivitäten von 5-200 MBq in 2 ml Medium mit einer Stunde Bestrahlungsdauer eingesetzt. So ergaben sich ohne Vorinkubation mit Perchlorat Dosen von 1,1-43,8 Gy, nach Perchloratzugabe wurden Dosen von 0,01-0,4 Gy erreicht. Nach der Bestrahlung wurden alle Proben 3 Mal mit 2 ml 37 °C warmen PBS gewaschen und für den Koloniebildungstest entsprechend weiterbearbeitet. Bei jedem der Versuche mit  $^{99m}\text{Tc}$  wurde außerdem der Uptake für 0,1 MBq/2 ml mit und ohne Perchlorat bestimmt. In Tab. 3 sind alle bei den Dosis-Wirkungskurven verwendeten Dosispunkte bzw. die zugegebenen Aktivitäten dargestellt.

Tab. 3: Dosispunkte und Aktivitäten der Dosis-Wirkungskurven

	Röntgen (Gy)	$^{99m}\text{Tc}$ +/- Perchlorat (MBq/2 ml)
Dosispunkte	0/0,05/0,5/1/2/5/7,5/10	0/5/20/50/100/200

Für die Auswertung der Dosis-Wirkungskurve nach Röntgenstrahlung wurde das Linear-Quadratische-Modell angewandt. Nach diesem Modell lässt sich das Zellüberleben mit folgender Formel beschreiben:

$$\ln SF = -\alpha D - \beta D^2$$

Hierbei entspricht  $\ln SF$  dem natürlichen Logarithmus der Überlebensfraktion und  $D$  der angewandten Dosis in Gray. Die Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  sind zell- und gewebsspezifisch. Das Modell ist besonders gut geeignet, um den Schulterbereich einer Überlebenskurve bei geringen Do-



sen (1-5 Gy) zu beschreiben. Die Anfangsneigung wird dabei von der linearen Komponente  $-\alpha D$  beschrieben, während die Krümmung der Kurve durch  $-\beta D^2$  bezeichnet wird (Kellerer and Rossi, 1973).

#### 2.2.4.2 Versuchsablauf zum Nachweis der Adaptiven Antwort

Die Adaptive Antwort wird als verbessertes Zellüberleben gegenüber einer Strahlenexposition nach Vorbestrahlung durch niedrige Dosen beschrieben. Um diese experimentell nachzuweisen, wurden die Zellen nach der Vorbestrahlung dreimal mit warmen PBS gewaschen und für eine gewisse Erholungszeit zurück in den Brutschrank gestellt. Nach Ablauf der Zeit erfolgte gegebenenfalls erneut eine Vorinkubation mit Perchlorat und es folgte die zweite Bestrahlung. Die Proben wurden wieder gewaschen und die Zellen wurden zum Koloniebildungstest ausgesät. Der experimentelle Ablauf zum Nachweis einer adaptiven Antwort ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Parallel zur Adaptiven Antwort wurde an jedem Versuchstag mit  $^{99m}\text{Tc}$  ein Uptake mit 0,1 MBq/2 ml mit und ohne Perchlorat durchgeführt.

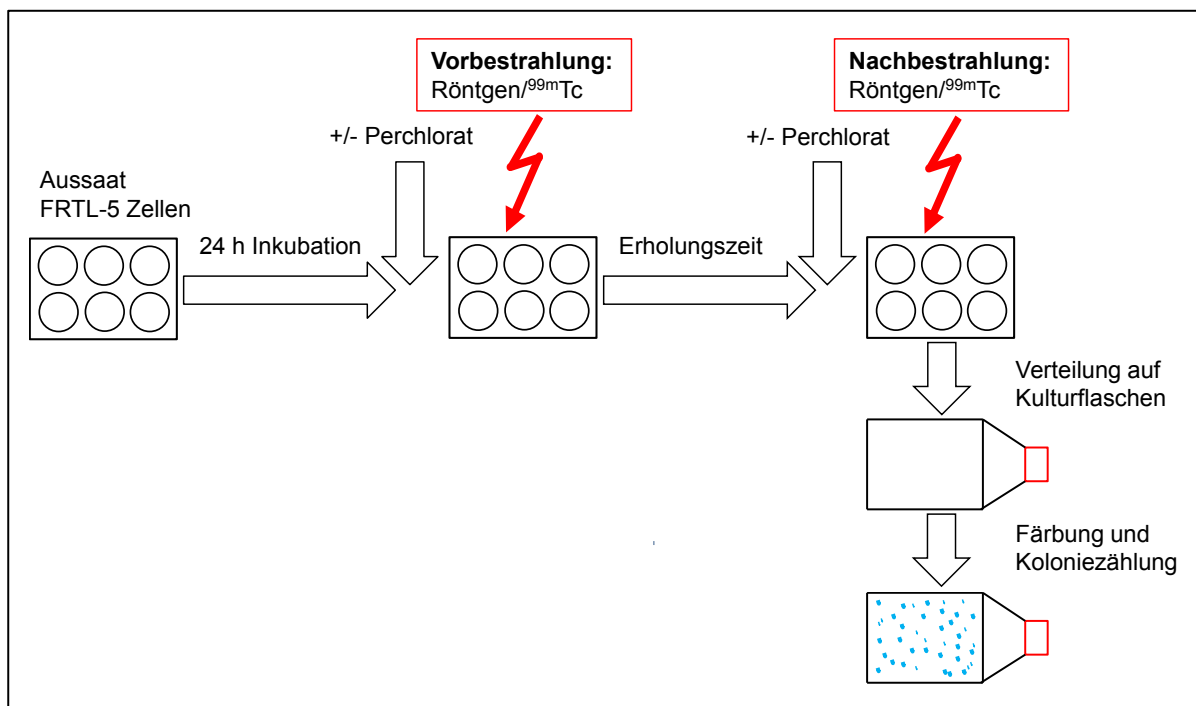


Abb. 1: Versuchsablauf Adaptive Antwort

Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis der Adaptiven Antwort durch Kombination von Röntgenstrahlung und  $^{99m}\text{Tc}$ . Die Bestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  wird durch Vorinkubation mit Perchlorat moduliert. In Vorversuchen sollen dazu geeignete Vorbestrahlungsdosen und Erholungszeiten bei Bestrahlung durch die gleiche Strahlenqualität ermittelt werden.

2.2.4.3 Dosistitration und Erholungszeitkinetik

Zur Ermittlung der optimalen Adaptiven Antwort wurde die Vorbestrahlungsdosis bei zweimaliger Bestrahlung durch die gleiche Strahlungsquelle variiert. Bei Bestrahlung durch die Röntgenröhre wurden zur Vorbestrahlung Dosen von 0,025 Gy bis zu 0,75 Gy eingesetzt. Entsprechend wurde auch bei Bestrahlung mit <sup>99m</sup>Tc mit und ohne Perchlorat die Vorbestrahlungsdosis von 0,01 Gy bis 0,5 Gy variiert. Die zur Dosistitration verwendeten Dosen, Aktivitäten und Erholungszeiten sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Dosispunkte und Erholungszeiten der Versuche zur Titration der Vorbestrahlungsdosis

				Nachbestrahlung					
				Röntgen		<sup>99m</sup> Tc		<sup>99m</sup> Tc+ Perchlorat	
Vorbestrahlung	Röntgen	Dosis (Gy)	Aktivität (MBq/2 ml)	Dosis (Gy)	Aktivität (MBq/2 ml)	Dosis (Gy)	Aktivität (MBq/2 ml)	Dosis (Gy)	Aktivität (MBq/2 ml)
		2		2	9,14	1	500		
		0,025							
		0,05							
		0,1							
		0,25							
	0,5								
	0,75								
		<sup>99m</sup> Tc	0,01	0,043			6 h		
			0,025	0,114					
	0,05		0,228						
	0,075		0,343						
	0,1		0,457						
	0,25		1,143						
	0,5		2,285						
	<sup>99m</sup> Tc+Perchlorat	0,01	5					6 h	
		0,025	12,5						
		0,05	25						
		0,075	37,5						
		0,1	50						
		0,25	125						
		0,5	250						

Mithilfe dieser Dosistitration wurden so diejenigen Dosiskombinationen bei Vor- und Nachbestrahlung ermittelt, bei denen die höchsten Adaptiven Antworten gemessen wurden. Diese Dosen wurden im Folgenden bei der Erholungszeitkinetik verwendet, um den am besten geeigneten Zeitraum zwischen erster und zweiter Bestrahlung zu ermitteln. Dazu wurden die Zellen gleichzeitig vorbestrahlt und in den Brutschrank zurückgestellt. Nach 2 h; 4 h; 6 h; 8 h;

10 h und 24 h wurden sie dann jeweils nachbestrahlt und zu Kolonien ausgesät. Die verwendeten Dosis- und Zeitpunkte sind in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Dosispunkte und Erholungszeiten der Versuche zur Titration der Erholungszeit

				Nachbestrahlung						
				Röntgen		<sup>99m</sup> Tc		<sup>99m</sup> Tc+ Perchlorat		
Vorbestrahlung		Dosis (Gy)	Aktivität (MBq/2 ml)	Dosis (Gy)	Aktivität (MBq/2 ml)	Dosis (Gy)	Aktivität (MBq/2 ml)	Dosis (Gy)	Aktivität (MBq/2 ml)	
					2		2	9,14	1	500
	Röntgen	0,05		2 h; 4 h; 6 h; 8 h; 10 h; 24 h						
	<sup>99m</sup> Tc	0,05	0,228		2 h; 4 h; 6 h; 8 h; 10 h; 24 h					
<sup>99m</sup> Tc+Perchlorat	0,05	25					2 h; 4 h; 6 h; 8 h; 10 h; 24 h			

Die Nachbestrahlungsdosis wurde auf 2 Gy festgelegt. Diese hatte sich in der Literatur (Schaffer, et al., 2004; Fan, et al., 2007), in vorrausgegangenen Dissertationen (Wendisch, 2010) und in eigenen Vorversuchen als geeignet erwiesen, um eine Adaptive Antwort nachzuweisen. Das entsprach bei Bestrahlung durch die Röntgenröhre einer Bestrahlungszeit von 1 min 39 s. Diese Dosis wurde bei Bestrahlung mit <sup>99m</sup>Tc ohne Perchlorat durch eine Aktivitätszugabe von 9,14 MBq/2 ml über eine Stunde erreicht. Aus Strahlenschutzgründen konnte bei einer Bestrahlung mit <sup>99m</sup>Tc und Perchlorat, durch Zugabe von 500 MBq/2 ml, nur eine Nachbestrahlungsdosis von 1 Gy erreicht werden.

#### 2.2.4.4 Nachweis der Adaptiven Antwort mit kombinierten Strahlenqualitäten

In den weiteren Experimenten sollten die Strahlenqualitäten bei Vor- und Nachbestrahlung variiert werden, also zum Beispiel die Vorbestrahlung mit der Röntgenröhre und die Nachbestrahlung mit <sup>99m</sup>Tc erfolgen. Nach Auswertung der vorrausgegangenen Dosistitrationen und Erholungszeitkinetiken wurde entschieden, immer mit 0,025 Gy und 0,05 Gy vorzubestrahlen und die Nachbestrahlung mit 2 Gy durchzuführen. Weiterhin wurde beschlossen, bei jedem

Versuch die Erholungszeiten 4 h; 6 h und 24 h zu verwenden. In Tab. 6 sind alle Dosispunkte und Erholungszeiten, die zur Untersuchung der Adaptiven Antwort mit kombinierten Strahlenqualitäten verwendet wurden, dargestellt.

Tab. 6: Dosispunkte und Erholungszeiten der Adaptiven Antwort mit kombinierten Strahlenqualitäten

				Nachbestrahlung						
				Röntgen		<sup>99m</sup> Tc		<sup>99m</sup> Tc+Perchlorat		
Vorbestrahlung		Dosis (Gy)	Aktivität (MBq/2 ml)	Dosis (Gy)	Aktivität (MBq/2 ml)	Dosis (Gy)	Aktivität (MBq/2 ml)	Dosis (Gy)	Aktivität (MBq/2 ml)	
						2		2	9,14	1
	Röntgen	0,025					4 h; 6 h; 24 h		4 h; 6 h; 24 h	
		0,05								
	<sup>99m</sup> Tc	0,025	0,114		4 h; 6 h; 24 h					
0,05		0,228								
<sup>99m</sup> Tc+Perchlorat	0,025	12,5		4 h; 6 h; 24 h						
	0,05	25								

#### 2.2.4.5 Statistik

Jeder Koloniebildungstest wurde an mindestens drei unabhängigen Versuchstagen wiederholt. In jedem Versuch wurden pro Dosispunkt drei Kulturflaschen mit Kolonien ausgesät und ausgezählt. Für jeden Dosispunkt konnte so das arithmetische Mittel und die dazugehörige Standardabweichung berechnet werden. Auch aus den Dosispunkten der drei Versuchstage wurde das arithmetische Mittel berechnet, die zugehörigen Standardabweichungen (SD) wurden mithilfe untenstehender Formel zur gepoolten Standardabweichung zusammengefasst:

$$SD_{\text{gepoolt}} = \sqrt{\frac{SD_1^2(n_1-1) + SD_2^2(n_2-1) + SD_3^2(n_3-1)}{(n_1+n_2+n_3)-3}}$$

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mithilfe des t-Tests für zwei unabhängige Stichproben ermittelt. Als Voraussetzung zur Anwendung des Tests müssen beide Stichproben einer annähernd normalverteilten Grundgesamtheit mit derselben Varianz entstammen. Die Nullhypothese lautet:  $H_0: \mu_1 = \mu_2$ . Sie sagt aus, dass sich die Erwartungswerte der beiden Stichproben nicht unterscheiden. Im Gegensatz dazu beinhaltet die Alternativhypothese  $H_A: \mu_1 \neq \mu_2$  die innovative Aussage, nämlich dass sich die Größen wahrhaft voneinander unterscheiden. Der p-Wert beschreibt die Wahrscheinlichkeit mit der die Nullhypothese zutrifft. Zur Berechnung musste die t-Verteilung und die Anzahl der Freiheitsgrade  $f$  ermittelt wer-

den. Soll sich ein Messwert signifikant von einem anderen unterscheiden, muss  $p < 0,05$  % betragen. Die statistischen Berechnungen wurden mithilfe der Graph Pad Software „Quick Calcs“ ausgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Dosis-Wirkungsbeziehung bei FRTL-5 Zellen

Als Voruntersuchung zum Nachweis der Adaptiven Antwort sollte die FRTL-5 Zelllinie hinsichtlich ihrer Strahlensensibilität charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden Koloniebildungstests nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung und  $^{99m}\text{Tc}$  durchgeführt. Durch die Exposition mit  $^{99m}\text{Tc}$  in An- und Abwesenheit von Perchlorat wird eine extra- und intrazelluläre Bestrahlung erreicht. Um gleiche Bestrahlungsbedingungen für die Zellen zu gewährleisten, wurde auch bei Anwendung der Röntgenstrahlung jeweils mit und ohne Vorinkubation von Perchlorat bestrahlt. Mithilfe der erhaltenen Dosis-Wirkungskurven wurde die Radiotoxizität, nach externer Bestrahlung durch Röntgenstrahlung, extrazellulärer Exposition mit  $^{99m}\text{Tc}+\text{ClO}_4^-$  und intrazellulärer Bestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  erfasst und verglichen. Die Ermittlung der Überlebenskurven sollte außerdem Ausgangspunkt zur Bestimmung des geeigneten Dosisbereichs zum Nachweis der Adaptiven Antwort sein.

Im Koloniebildungstest wird das klonogene Überleben nach Bestrahlung von Zellen detektiert. Wie zuvor beschrieben, wurden die Zellen am Vortag ausgesät. Vor der Bestrahlung wurde ein Teil der Zellen mit Perchlorat versetzt. Nach der jeweiligen Bestrahlungszeit folgte die Aussaat und 13 tägige Inkubation der Kolonien. Nach Fixation und Färbung folgte die Auszählung der Kolonien. Es wurde die Plattiereffizienz und die Überlebensfraktion berechnet.

#### 3.1.1 Klonogenes Überleben nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung

Zur Bestrahlung in der Röntgenröhre wurde die Bestrahlungsdauer für die Dosispunkte (0 Gy; 0,05 Gy; 0,5 Gy; 1 Gy; 2 Gy; 5 Gy; 7 Gy, 5 Gy; 10 Gy) von 4 s bis 8 min 7 s variiert. Pro Dosispunkt wurde die geeignete Zellzahl in Vorversuchen ermittelt. Die Dosiswirkungskurve für die Bestrahlung durch die Röntgenröhre mit und ohne Perchlorat ist in Abb. 2 dargestellt.

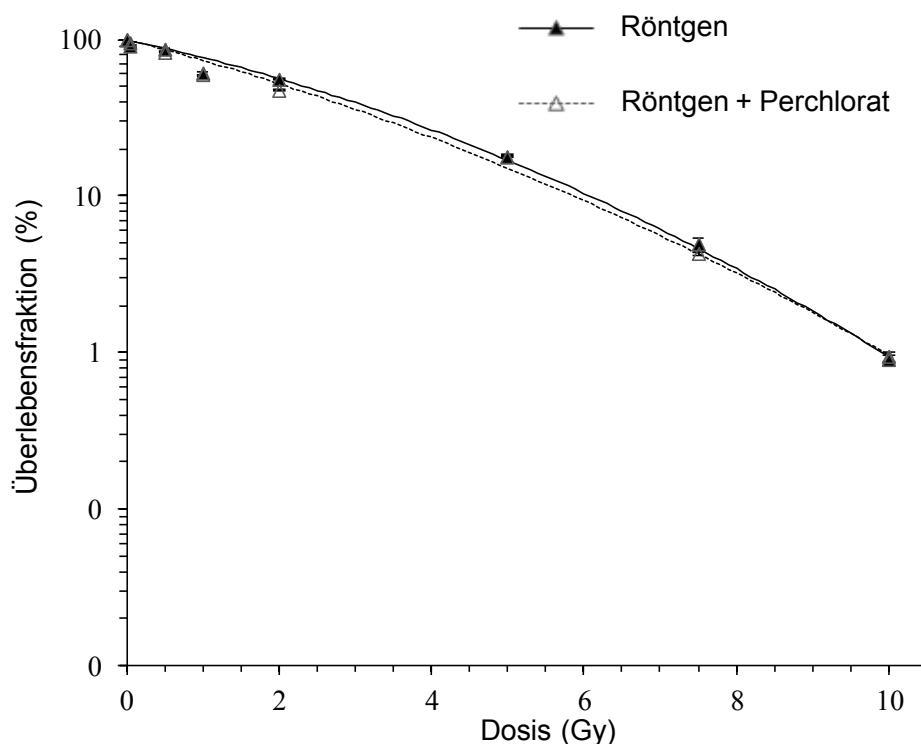


Abb. 2: Überlebensfraktionen von FRTL-5 Zellen nach Röntgenbestrahlung in An- oder Abwesenheit von Perchlorat in Abhängigkeit von der Dosis. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung sowie der linear quadratische Kurvenfit.

Im Diagramm ist das Überleben in Abhängigkeit von der Dosis aufgetragen. In dieser halb-logarithmischen Darstellung stellen sich die Graphen als Schulterkurven dar, was auf eine linear-quadratische Abhängigkeit von Dosis und Zellüberleben schließen lässt. Durch Steigerung der Dosis zeigte sich ein zunehmend steiler Abfall der Überlebensfraktion, sodass in beiden Versuchsreihen bei einer Dosis von 10 Gy nur noch ein Zellüberleben von 0,9 % beobachtet werden konnte. Aus dem Kurvenfit wurde die  $D_{37}$  ermittelt. Sie bezeichnet diejenige Dosis, bei der noch 37 % der Zellen überlebten. In diesem Versuch betrug die  $D_{37}$  für Röntgenstrahlung ohne Perchloratzugabe 3,2 Gy und mit Perchloratzugabe 2,9 Gy. In dem Diagramm ist zudem ersichtlich, dass die Zugabe von Perchlorat vor der Bestrahlung keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenskurve hat.

### 3.1.2 Klonogenes Überleben nach Bestrahlung mit $^{99m}\text{Tc} \pm$ Perchlorat

Zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurve mit  $^{99m}\text{Tc}$  erfolgte die Bestrahlung über eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank sowohl mit als auch ohne Perchloratvorinkubation. Die verwendeten Aktivitäten reichten von 5 bis 200 MBq pro 2ml Medium, daraus errechnen sich die in Tab. 7 dargestellten Dosen bei intra- und extrazellulärer Bestrahlung. Es wurde ein Uptake-

versuch durchgeführt, um den Anteil der intrazellulären Radionuklidaufnahme und deren Inhibition durch Perchlorat kontrollieren zu können. Der Uptake pro 0,25 Mio. Zellen betrug ohne Perchlorat 2,16 % und mit Perchloratvorinkubation 0,04 %.

Tab. 7: Nach 2.1.2.3 berechnete Dosen nach einstündiger  $^{99m}\text{Tc}$  Bestrahlung mit und ohne Perchlorat

Aktivitätskonzentration (MBq/2 ml)	Dosis (Gy) mit Perchlorat	Dosis (Gy) ohne Perchlorat
0	0,00	0,00
5	0,01	1,09
20	0,04	4,38
50	0,10	10,94
100	0,20	21,88
200	0,40	43,76

In Abb. 3 ist ersichtlich, dass beim intrazellulären Bestrahlungsmodus mit  $^{99m}\text{Tc}$  das Zellüberleben bei gleicher Aktivität wesentlich geringer ist als beim extrazellulären Bestrahlungsmodus mit  $^{99m}\text{Tc}$  und Perchlorat. Bei der Bestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  ohne Perchlorat fällt das Zellüberleben steil ab und liegt bereits bei Zugabe von 200 MBq unter 0,2 %. Die  $D_{37}$  betrug hier 3,9 Gy, dies entspricht einer Aktivität von 17 MBq. Bei Bestrahlung nach Vorinkubation mit Perchlorat ist der Kurvenverlauf wesentlich flacher und bei 200 MBq  $^{99m}\text{Tc}$  überleben noch 49,7 % der Zellen. Bei dieser extrazellulären Bestrahlungsmodalität und Aktivität konnte somit keine  $D_{37}$  erstellt werden.



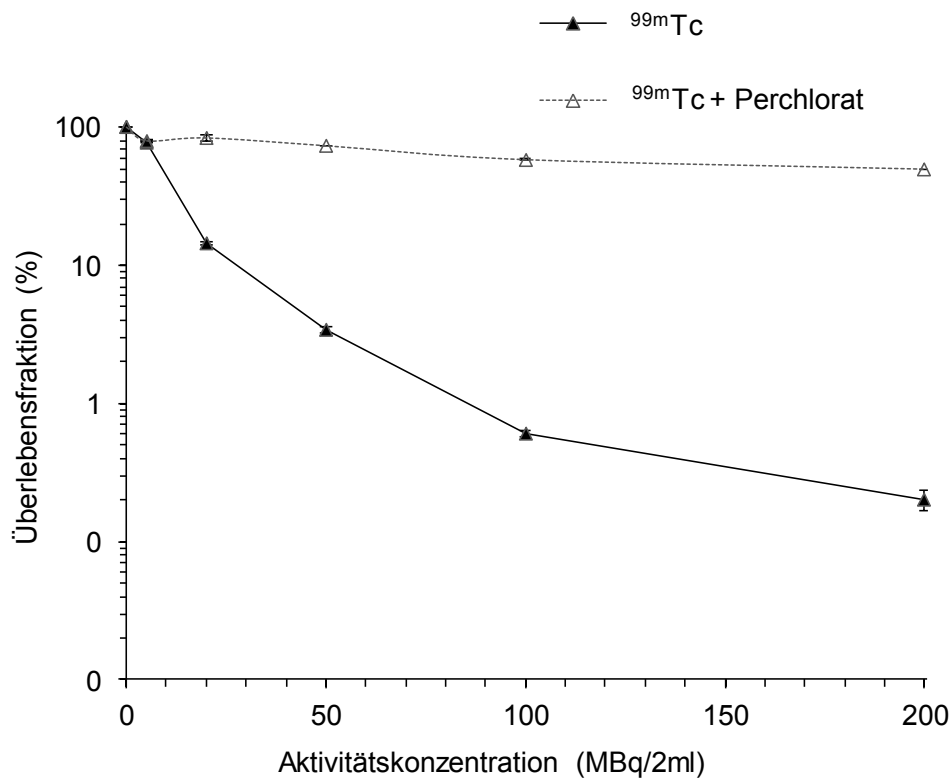


Abb. 3: Überlebensfraktionen von FRTL-5 Zellen nach Bestrahlung durch  $^{99m}\text{Tc}$  mit und ohne Perchloratinkubation in Abhängigkeit von der zugegebenen Aktivität. Es sind jeweils die Mittelwerte aus 3 Versuchen und deren gepoolte Standardabweichung dargestellt.

### 3.2 Nachweis der Adaptiven Antwort bei externer Bestrahlung mit der Röntgenröhre

Zum Nachweis der Adaptiven Antwort sollten zunächst geeignete Dosiskombinationen für Vor- und Nachbestrahlung und ein geeignetes Intervall zwischen den Bestrahlungen ermittelt werden. In den bisher veröffentlichten Nachweisen der Adaptiven Antwort (Wang, et al., 1991; Cai, 1999; Matsumoto, et al., 2007a) wurden Vorbestrahlungsdosen  $<0,5$  Gy und Intervalle von 4-6 h verwendet. Um die Dosis von 0,05 Gy einzustellen, musste die Dosisleistung bei den niedrigen Vorbestrahlungsdosen auf 0,1235 Gy/min reduziert werden, während die Nachbestrahlung mit einer Dosisleistung von 1 Gy/min durchgeführt werden konnte. Es wurde eine Variation der Vorbestrahlungsdosis und des Erholungszeitintervalls durchgeführt. Die Nachbestrahlungsdosis wurde auf 2 Gy festgelegt, sie erwies sich in den Vorversuchen als geeignet. Es wird als Nachweis für eine Adaptive Antwort gesehen, wenn das Zellüberleben der vorbestrahlten Zellen signifikant ( $p \leq 0,05$ ) höher ist, als das der nicht vorbestrahlten Zellen.

### 3.2.1 Abhängigkeit der Adaptiven Antwort von der Vorbestrahlungsdosis zu verschiedenen Erholungszeiten

Um geeignete Vorbestrahlungsdosen für die externe Röntgenstrahlung zu finden, wurde die Dosis von 0,025 Gy bis 0,75 Gy variiert. Dafür wurde die Dosisleistung durch Absenken der Stromstärke auf 2 mA auf 0,1235 Gy/min reduziert. Die benötigten Bestrahlungszeiten zum Erreichen der verwendeten Vorbestrahlungsdosis sind in Tab. 8 dargestellt. Die FRTL-5 Zellen wurden nach der Bestrahlung bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bevor die Nachbestrahlung bei 2 Gy und einer Dosisleistung von 1,235 Gy/min erfolgte. Die Folgebestrahlung erfolgte nach 4 h; 6 h oder 24 h, um Unterschiede des adaptiven Effektes in Abhängigkeit vom Erholungszeitraum zu detektieren.

Tab. 8: Bestrahlungsdauer der Vorbestrahlungsdosen bei 2 mA Stromstärke und 0,1235 Gy/min

Vorbestrahlungsdosis	Bestrahlungsdauer
0,025 Gy	14 s
0,05 Gy	26 s
0,1 Gy	50 s
0,25 Gy	2 min 2 s
0,5 Gy	4 min 2 s
0,75 Gy	6 min 3 s

In Abb. 4 Teil A ist ersichtlich, dass nach einem Zeitintervall von 4 h bei keiner der Vorbestrahlungsdosen eine Adaptive Antwort nachweisbar war. Das heißt, die Zellen die nicht vorbestrahlt wurden (0 Gy) erreichten mit 57,5 % eine höhere Überlebensfraktion als die vorbestrahlten Zellen. Im Unterschied dazu war (im Teil B der Abb. 4) bei einem Zeitintervall von 6 h das Überleben bei den mit 0,025 Gy (56,4 %) und mit 0,05 Gy (64,8 %) vorbehandelten Zellen signifikant höher als bei der Reihe der nicht vorbestrahlten Zellen (52,4 %). Bei den Vorbestrahlungswerten von 0,1 Gy (51,6 %) bis 0,75 Gy (43,5 %) war dieser Effekt nicht zu beobachten. In den Versuchen nach 24 h Erholungszeit (Abb. 4 Teil C) war das Zellüberleben der vorbestrahlten Proben signifikant geringer als das der rein nachbestrahlten Zellen (62,2 %).

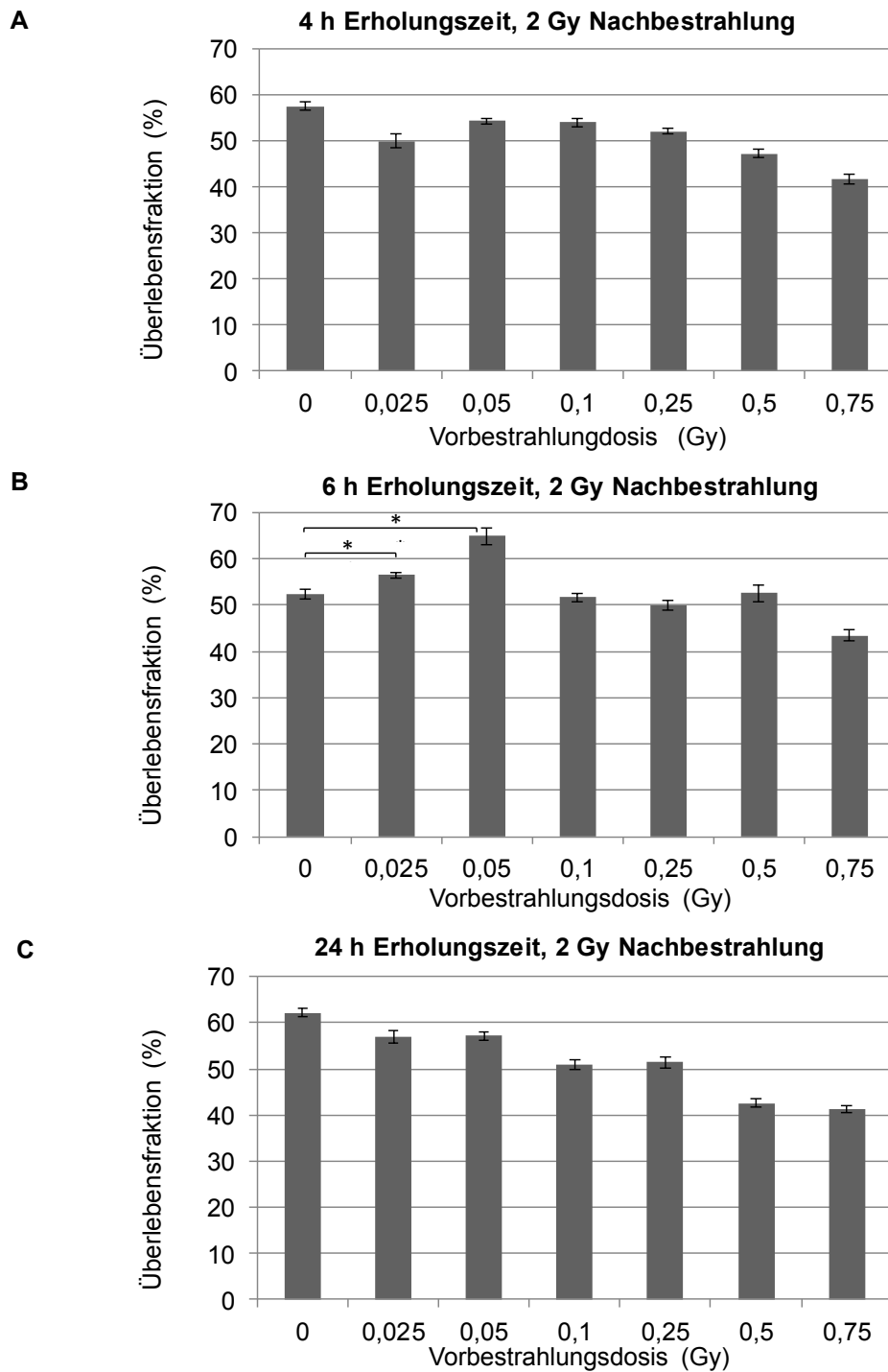


Abb. 4: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen nach Röntgenbestrahlung der FRTL-5 Zellen in Abhängigkeit von der Vorbestrahlungsdosis. In Bild A wurde nach 4 h, in Bild B nach 6 h und in Bild C nach 24 h mit 2 Gy folgebestrahlt. Abgebildet sind Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p \leq 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen.

Diese Beobachtungen zeigen, dass die Adaptive Antwort mittels externer Bestrahlung durch die Röntgenröhre bei einem Zeitintervall von 6 h, den Vorbestrahlungsdosen von 0,025 Gy und 0,05 Gy und einer Nachbestrahlung mit 2 Gy mit FRTL-5 Zellen nachweisbar ist.

### 3.2.2 Abhängigkeit der Adaptiven Antwort von der Erholungszeit

Nachdem sich die Dosiskombination von 0,05 Gy und 2 Gy als geeignet zum Nachweis der Adaptiven Antwort mittels Röntgenstrahlung erwiesen hat, soll nun in der Zeittitration das geeignete Intervall zwischen erster und zweiter Bestrahlung ermittelt werden. So sollte untersucht werden, ab wann der Effekt auftritt und ob er über mehrere Zellzyklusphasen anhält (Cai and Liu, 1990). Dazu wurden die Zellen mit 0,05 Gy bei einer Dosisleistung von 0,1235 Gy/min vorbestrahlt und anschließend im Brutschrank bei 37 °C bis zur zweiten Bestrahlung inkubiert. Die Nachbestrahlung der Zellen erfolgte jeweils nach 2 h; 4 h; 6 h; 8 h; 10 h und 24 h mit 2 Gy (Dosisleistung 1,235 Gy/min). In Abb. 5 werden jeweils die Überlebensfraktionen von vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen nach den unterschiedlichen Erholungszeiten miteinander verglichen.

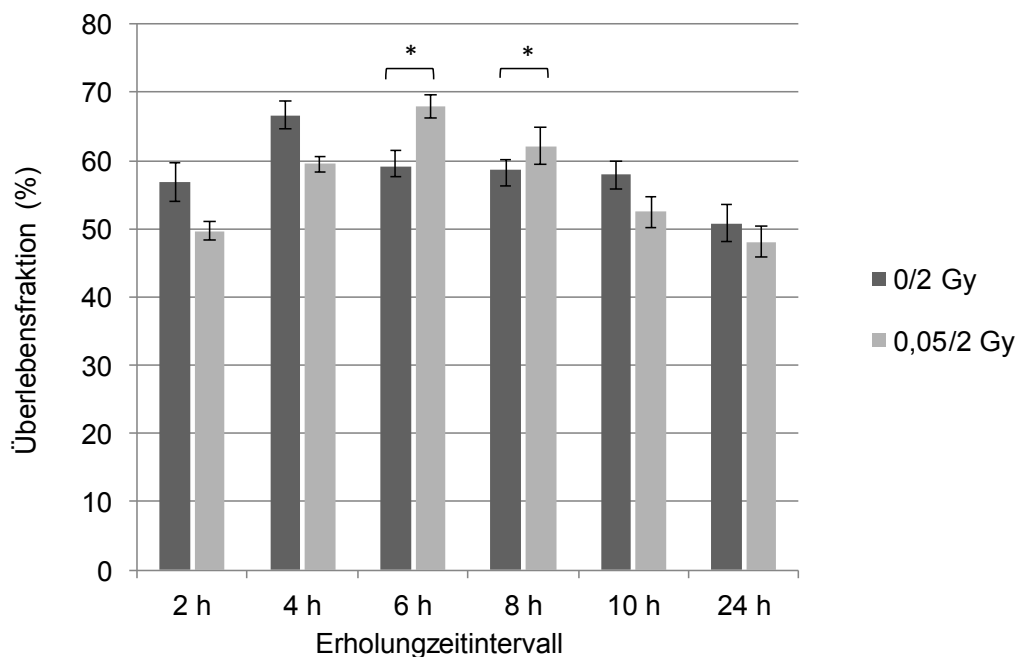


Abb. 5: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen nach Röntgenbestrahlung der FRTL-5 Zellen in Abhängigkeit von den Erholungszeitintervallen. Zu jedem Zeitpunkt wird eine vorbestrahlte mit einer nicht vorbestrahlten Probe verglichen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p \leq 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen.

In Abb. 5 ist ersichtlich, dass bei 0,05 Gy Vorbestrahlung, 6 h Erholungszeit und 2 Gy Nachbestrahlung das Zellüberleben 67,9 % betrug, ohne Vorbestrahlung überlebten dagegen nur 59,1 % der Zellen. Auch nach 8 h Erholungszeit überlebten mehr vorbestrahlte (62,1 %) als nicht vorbestrahlte (58,6 %) Kolonien. Bei den übrigen Intervallen (2 h; 4 h; 10 h; 24 h) waren die Überlebensfraktionen der vorbestrahlten Zellen stets signifikant kleiner als die der nicht vorbestrahlten Proben. Somit konnte im Koloniebildungstest nach 6 h und 8 h ein signifikan-

ter protektiver Effekt im Sinne einer höheren Überlebensfraktion nach Vorbestrahlung nachgewiesen werden. In diesen Experimenten scheint der Effekt der Adaptiven Antwort erst ab einer Erholungszeit von 6 h aufzutreten, bereits nach 10 h ist dieser Effekt nicht mehr nachweisbar. Nach 24 h lässt sich ebenfalls kein Unterschied mehr zwischen vor- und nicht vorbestrahlten Zellen feststellen.

### **3.3 Nachweis der Adaptiven Antwort bei extrazellulärer Bestrahlung mit $^{99m}\text{Tc}$ und Perchlorat-Vorinkubation**

Um die Adaptive Antwort mit offenen Radionukliden nachzuweisen, wurden auch hier eine Dosisvariation zur Ermittlung der optimalen Vorbestrahlungsdosis und eine Erholungszeitvariation zur Bestimmung des idealen Zeitfensters zwischen Vor- und Nachbestrahlung durchgeführt. Vor beiden Bestrahlungen wurden alle Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  Perchlorat inkubiert, sodass bei einem Uptake von  $< 0,06 \%$  / 0,25 Mio. Zellen von einer extrazellulären Bestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  ausgegangen werden kann. Bei einer Bestrahlungsdauer von 1 h hätte eine Aktivität von 1 GBq pro Well appliziert werden müssen, um eine Nachbestrahlungsdosis von 2 Gy zu erzeugen. Aus strahlenhygienischen Gründen wurde die Nachbestrahlungsdosis deshalb auf 1 Gy reduziert, sodass pro Well (2 ml Medium) 500 MBq  $^{99m}\text{Tc}$  zugegeben wurden.

#### **3.3.1 Abhängigkeit der Adaptiven Antwort von der Vorbestrahlungsdosis nach 6 h Erholungszeit**

Für die Ermittlung der geeigneten Vorbestrahlungsdosis wurde bei Bestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  und Perchlorat ein Erholungszeitintervall von 6 h ausgewählt. Dieses hatte sich beim Nachweis der Adaptiven Antwort mit Röntgenstrahlung als geeignet erwiesen, sodass man bei gleichem extrazellulärem Bestrahlungsmodus, gleicher Zelllinie und ähnlichem Versuchsaufbau von einer Übertragbarkeit ausgehen konnte. In Tab. 9 sind die zugegebenen Aktivitäten und die über 1 h Bestrahlungsdauer erzeugten errechneten Vorbestrahlungsdosen dargestellt. Diese erstrecken sich von 0,01 Gy (5 MBq/2 ml) bis 0,5 Gy (250 MBq/2 ml). Alle Zellen wurden mit 500 MBq/2 ml  $^{99m}\text{Tc}$  über 1 h nachbestrahlt, was einer applizierten Dosis von 1 Gy entspricht. Der Uptake von 0,1 MBq/2 ml über 1 h nach Vorinkubation mit Perchlorat betrug 0,06 % pro 0,25 Mio. Zellen.

Tab. 9: Dargestellt sind die errechneten Vorbestrahlungsdosen, die sich aus einer einstündigen Bestrahlung mit den angegebenen Aktivitäten  $^{99m}\text{Tc}$  nach Vorinkubation mit 50  $\mu\text{l}$  Perchlorat ergeben.

Aktivitätskonzentration (MBq/2 ml)	Dosis (Gy)
5	0,01
12,5	0,025
25	0,05
37,5	0,075
50	0,1
125	0,25
250	0,5

Bei diesem Versuch konnten bei den Vorbestrahlungsdosen 0,01 Gy (66,4 %), 0,025 Gy (70,3 %), 0,05 Gy (76,5 %) und 0,075 Gy (65,2 %) signifikant höhere Überlebensfraktionen als bei den nicht vorbestrahlten Zellen (60,2 %) ermittelt werden, wie in Abb. 6 ersichtlich. Bei den Messpunkten für 0,1 Gy (57,6 %), 0,25 Gy (55,0 %) und 0,5 Gy (48,5 %) sank die Überlebensfraktion mit steigender Vorbestrahlungsdosis und lag stets unter dem Zellüberleben der rein nachbestrahlten Probe (60,2 %). Somit konnte für die zweimalige Bestrahlung der FRTL-5 Zellen mit  $^{99m}\text{Tc}$  nach Perchloratvorinkubation für die Vorbestrahlungsdosen von 0,01 Gy bis 0,075 Gy, eine Erholungszeit von 6 h und die Nachbestrahlung mit 1 Gy die Adaptive Antwort nachgewiesen werden. Bei der Vorbestrahlungsdosis 0,05 Gy ließ sich der größte signifikante Effekt beobachten. Das Zellüberleben konnte hier durch Vorbestrahlung um 27,1 %, im Vergleich zu den nicht vorbestrahlten Zellen, gesteigert werden.

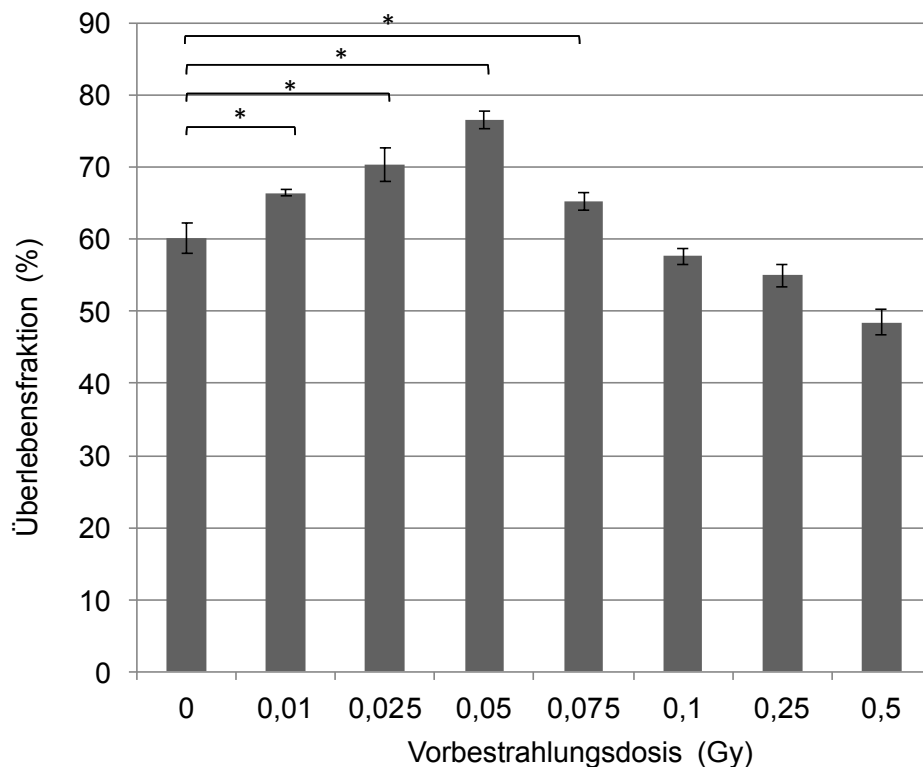


Abb. 6: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der FRTL-5 Zellen nach Vor- und Nachbestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  und jeweiliger Vorinkubation mit Perchlorat in Abhängigkeit von der Vorbestrahlungsdosis. Die nach 6 h Erholungszeit applizierte Nachbestrahlungsdosis betrug 1 Gy. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p \leq 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen.

### 3.3.2 Abhängigkeit der Adaptiven Antwort von der Erholungszeit

Zur Ermittlung des optimalen Erholungszeitraumes wurden als Dosispunkte für die Vorbestrahlung 0,05 Gy (25 MBq/2 ml) und für die Nachbestrahlung 1 Gy (500 MBq/2 ml) gewählt, da diese Kombination in der vorrausgegangenen Dosistitration die höchste Adaptive Antwort erzielte. Vor beiden einstündigen Bestrahlungen erfolgte jeweils die 15 minütige Inkubation mit 50  $\mu\text{l}$  Perchlorat bei 37 °C. Die Erholungszeit wurde von 2 h bis 24 h variiert. Der Uptake von 0,1 MBq/2 ml über 1 h nach Vorinkubation mit Perchlorat betrug im Durchschnitt 0,06 % pro 0,25 Mio. Zellen.

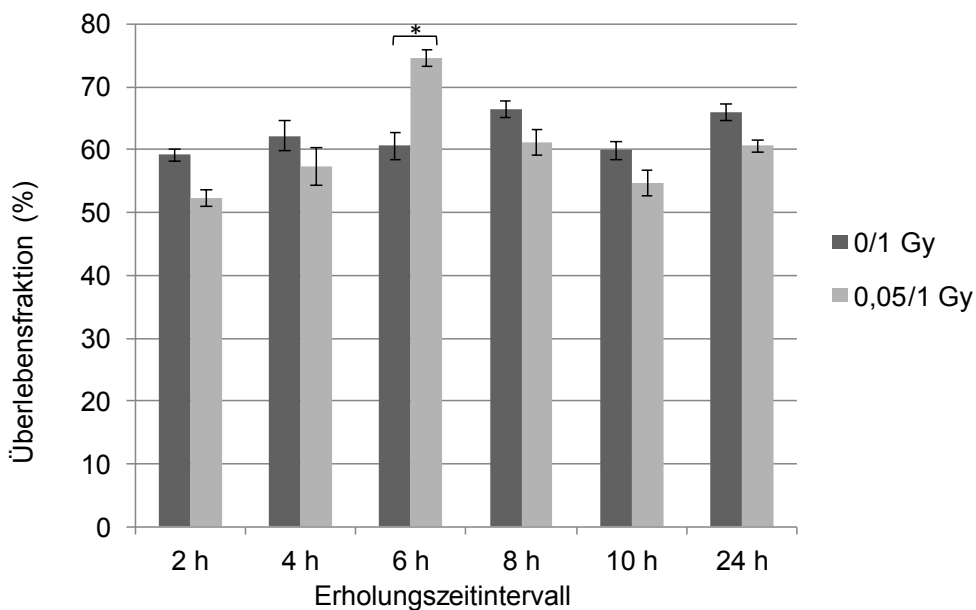


Abb. 7: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der FRTL-5 Zellen nach Vor- und Nachbestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  und jeweiliger Vorinkubation mit Perchlorat in Abhängigkeit von den Erholungszeitintervallen. Zu jedem Zeitpunkt wird eine vorbestrahlte mit einer nicht vorbestrahlten Probe verglichen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen.

In Abb. 7 wird ersichtlich, dass nur bei einem Erholungszeitintervall von 6 h zwischen erster und zweiter Bestrahlung die vorbestrahlten Zellen mit 74,5 % eine signifikant höhere Überlebensfraktion als die Kontrollen mit 60,6 % aufwiesen. Zu allen anderen Zeitpunkten war kein protektiver Effekt auf das Zellüberleben durch Vorbestrahlung zu erkennen.

Somit konnte die Adaptive Antwort mit zweimaliger Bestrahlung durch  $^{99m}\text{Tc}$  und Perchlorat zu einem Zeitpunkt (6 h) nachgewiesen werden. Bei der Röntgenstrahlung zeigte sich dagegen eine Adaptive Antwort sowohl nach 6 h als auch nach 8 h Erholungszeit.

### 3.4 Nachweis der Adaptiven Antwort bei Bestrahlung mit $^{99m}\text{Tc}$

Wie bereits bei zweimaliger extrazellulärer Bestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  und Perchlorat sollte auch bei der intrazellulären Bestrahlung durch  $^{99m}\text{Tc}$  ohne Perchloratzusatz zunächst eine Titration der Vorbestrahlungsdosis und dann eine Erholungszeitkinetik erstellt werden. Die Nachbestrahlungsdosis von 2 Gy konnte hier bereits durch Zugabe von 9,14 MBq erreicht werden. An jedem Versuchstag wurde ein Uptake mit 0,1 MBq/2 ml  $^{99m}\text{Tc}$  über 1 h bezogen auf 0,25 Mio. Zellen durchgeführt.



### 3.4.1 Abhängigkeit der Adaptiven Antwort von der Vorbestrahlungsdosis nach 6 h Erholungszeit

Zur Bestimmung der optimalen Vorbestrahlungsdosis wurden die Zellen nach Vorbestrahlung (über 1 h) für 6 h inkubiert, bevor die Nachbestrahlung mit 2 Gy erfolgte. Die Erholungszeit von 6 h wurde gewählt, weil sowohl bei der externen Bestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  als auch bei Röntgenstrahlung ein Nachweis der Adaptiven Antwort gezeigt wurde. Die verwendeten errechneten Vorbestrahlungsdosen und die dazugehörigen Aktivitäten sind in Tab. 10 dargestellt. Der mittlere Uptake von 0,1 MBq/2 ml über 1 h betrug in diesen Versuchen im Mittelwert 2,08 % pro 0,25 Mio. Zellen.

Tab. 10: Dargestellt sind die errechneten Vorbestrahlungsdosen, die sich aus einer einstündigen Bestrahlung mit den angegebenen Aktivitäten  $^{99m}\text{Tc}$  ergeben.

Aktivitätskonzentration (MBq/2 ml)	Dosis (Gy)
0,045	0,01
0,114	0,025
0,228	0,05
0,342	0,075
0,457	0,1
1,142	0,25
2,285	0,5

Wie in Abb. 8 ersichtlich, konnten bei den drei Vorbestrahlungsdosen 0,025 Gy; 0,05 Gy und 0,075 Gy mit 51,7 %, 54,5 % und 46,5 % signifikant höhere Überlebensfraktionen als bei den nicht vorbestrahlten Proben mit 43,3 % Zellüberleben erzielt werden. Zwischen den Kontrollen und den Zellen mit der Vorbestrahlungsdosis 0,01 Gy konnte kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,5164$ ) festgestellt werden. Bei den übrigen Vorbestrahlungsdosen (0,1 Gy; 0,25 Gy und 0,5 Gy) waren die Überlebensfraktionen mit 38,4 %, 36,6 % und 31,0 % im Vergleich zu den nicht vorbestrahlten Zellen signifikant geringer. Das Zellüberleben sank hier mit steigender Vorbestrahlungsdosis.

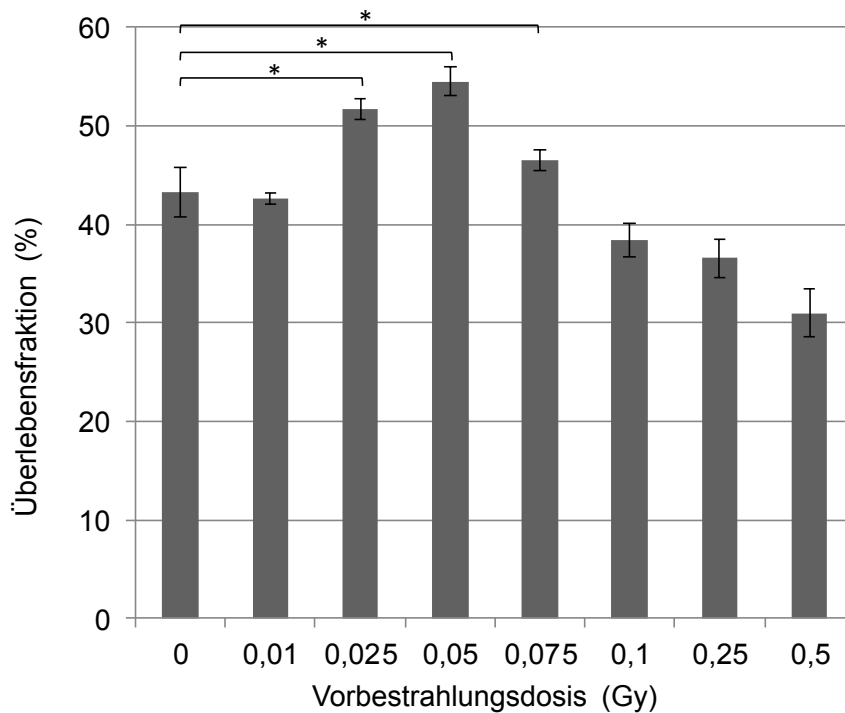


Abb. 8: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der FRTL-5 Zellen nach zweimaliger Bestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  in Abhängigkeit von der Vorbestrahlungsdosis. Die nach 6 h Erholungszeit applizierte Nachbestrahlungsdosis betrug 2 Gy. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen.

Die Adaptive Antwort ließ sich beim intrazellulären Bestrahlungsmodus ( $^{99m}\text{Tc}$  ohne Perchloratinkubation) nach 6 h Erholungszeit und mit 2 Gy Nachbestrahlungsdosis für drei Vorbestrahlungsdosen (0,025 Gy; 0,05 Gy und 0,075 Gy) nachweisen.

### 3.4.2 Abhängigkeit der Adaptiven Antwort von der Erholungszeit

Da auch bei Bestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  ohne Perchlorat bei der Variation der Vorbestrahlungsdosis die Kombination aus 0,05 Gy (228,5 kBq/2 ml) Vorbestrahlung und 2 Gy (9,14 MBq/2 ml) Folgebestrahlung die höchste Adaptive Antwort erzielte, wurde diese auch in der Zeittitration verwendet. Bei gleichzeitiger Vorbestrahlung wurden die Zellen für die jeweiligen Erholungszeiten inkubiert, bevor die Nachbestrahlung erfolgte. Wie in den vorrausgegangenen Zeittitrationen (siehe 3.2.2 und 3.3.2) wurden 2 h; 4 h; 6 h; 8 h; 10 h und 24 h als Erholungszeiten gewählt. Der Uptake mit 0,1 MBq/2 ml  $^{99m}\text{Tc}$  über 1 h betrug im Durchschnitt 1,63 % pro 0,25 Mio. Zellen.

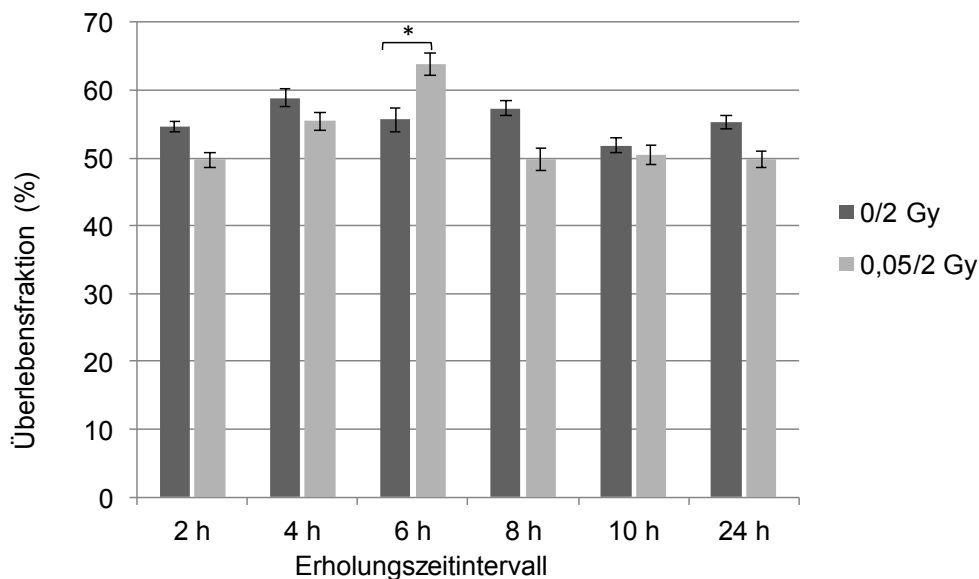


Abb. 9: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der FRTL-5 Zellen nach Vor- und Nachbestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  in Abhängigkeit von den Erholungszeitintervallen. Zu jedem Zeitpunkt wird eine vorbestrahlte mit einer unvorbestrahlten Probe verglichen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen.

In Abb. 9 wird zu jedem Zeitpunkt jeweils eine nicht vorbestrahlte mit einer vorbestrahlten Probe verglichen. Zu jedem Zeitpunkt waren die Überlebensfraktionen signifikant verschieden. Aber nur bei 6 h Erholungszeit war die Überlebensfraktion der mit 0,05 Gy vorbestrahlten Probe mit 63,8 % signifikant höher, als die der nicht vorbestrahlten Zellen mit 55,6 %.

In dieser Versuchsanordnung konnte nur bei 6 stündiger Erholungszeit eine Adaptive Antwort nachgewiesen werden. Zusammenfassend kann für die Kombination der Strahlenqualitäten gesagt werden, dass dies dem Ergebnis der Zeittitration mit  $^{99m}\text{Tc}$  und Perchlorat entspricht. Nur bei zweimaliger Bestrahlung mit der Röntgenröhre konnte nicht nur bei 6 h Erholungszeit, sondern auch nach 8 h ein protektiver Effekt durch Vorbestrahlung nachgewiesen werden.

### 3.5 Nachweis der Adaptiven Antwort bei Kombination der Strahlenqualitäten

In den bisherigen Versuchen war es gelungen die Adaptive Antwort von FRTL-5 Zellen nachzuweisen. Dabei erfolgte die Vor- und Nachbestrahlung jeweils durch die gleiche Strahlenqualität. Bei allen bisher durchgeführten Kombinationen (Röntgen/Röntgen,  $^{99m}\text{Tc}$ +Perchlorat/ $\text{Tc}^{99m}$ +Perchlorat,  $^{99m}\text{Tc}/^{99m}\text{Tc}$ ) erwies sich in den Dosis- und Zeittitrationen die Kombination aus 0,05 Gy Vorbestrahlung und 6 h Erholungszeit als optimale Bedingung zur Erzeugung der Adaptiven Antwort. In den folgenden Versuchen sollte ermittelt werden, ob die Adaptive Antwort auch durch Kombination verschiedener Strahlenqualitäten hervorge-

rufen werden kann. So sollte beispielsweise ermittelt werden, ob auch eine Vorbestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  eine protektive Wirkung auf eine Nachbestrahlung mit Röntgenstrahlung haben kann. Bei diesen Versuchen sollte, unabhängig von der Strahlenqualität, mit 0 Gy; 0,025 Gy oder 0,05 Gy vorbestrahlt und mit 2 Gy nachbestrahlt werden (siehe Tab. 6). Wie in den vorausgegangenen Versuchen konnte bei der Nachbestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  und Perchlorat aus strahlenhygienischen Gründen nur eine Nachbestrahlungsdosis von 1 Gy erreicht werden. Bei der Auswertung wurden die Überlebensfraktionen der nicht vorbestrahlten Probe mit denen der vorbestrahlten Proben verglichen. Als Erholungszeiten zwischen den Bestrahlungen wurden 4 h; 6 h und 24 h ausgewählt. So sollte neben dem Nachweis der Adaptiven Antwort nach 6 h auch ein Anfangs- (4 h) und Endpunkt (24 h) des Effekts erfasst werden.

### **3.5.1 Nachweis der Adaptiven Antwort bei Vorbestrahlung mit Röntgenstrahlung und Nachbestrahlung mit $^{99m}\text{Tc}$**

In diesem Versuch sollte die Adaptive Antwort durch Kombination der Bestrahlungen aus Röntgenstrahlung und Bestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  nachgewiesen werden. Dazu wurden die Zellen 24 h vor Versuchsbeginn zu 0,25 Mio. Zellen pro Well ausgesät. Am Versuchstag wurden alle Zellen mit Wärme-Akkus zur Röntgenröhre transportiert und mit 0,025 Gy oder 0,05 Gy vorbestrahlt. Dazu wurde eine Dosisleistung von 0,1235 Gy/min eingestellt. Es ergaben sich Bestrahlungszeiten von 14 s für 0,025 Gy und 26 s für 0,05 Gy. Die Vergleichsprobe blieb unbestrahlt. Nach der Bestrahlung erfolgte die Inkubation für die jeweiligen Erholungszeiten von 4 h; 6 h und 24 h. Nach Ablauf der Erholungszeit wurden die Zellen mit 9,14 MBq über eine Stunde nachbestrahlt. Diese Aktivität entspricht einer Nachbestrahlungsdosis von 2 Gy. Nach Abwaschen der Aktivität wurden die Zellen zum Koloniebildungstest ausgesät. Nach 13 d Inkubation erfolgte die Fixierung und Färbung. Nach der Koloniezählung wurde die Überlebensfraktion berechnet. Der Uptake von 0,1 MBq/2 ml über eine Stunde betrug bei diesen Versuchen im Durchschnitt 1,76 % pro 0,25 Mio. Zellen.

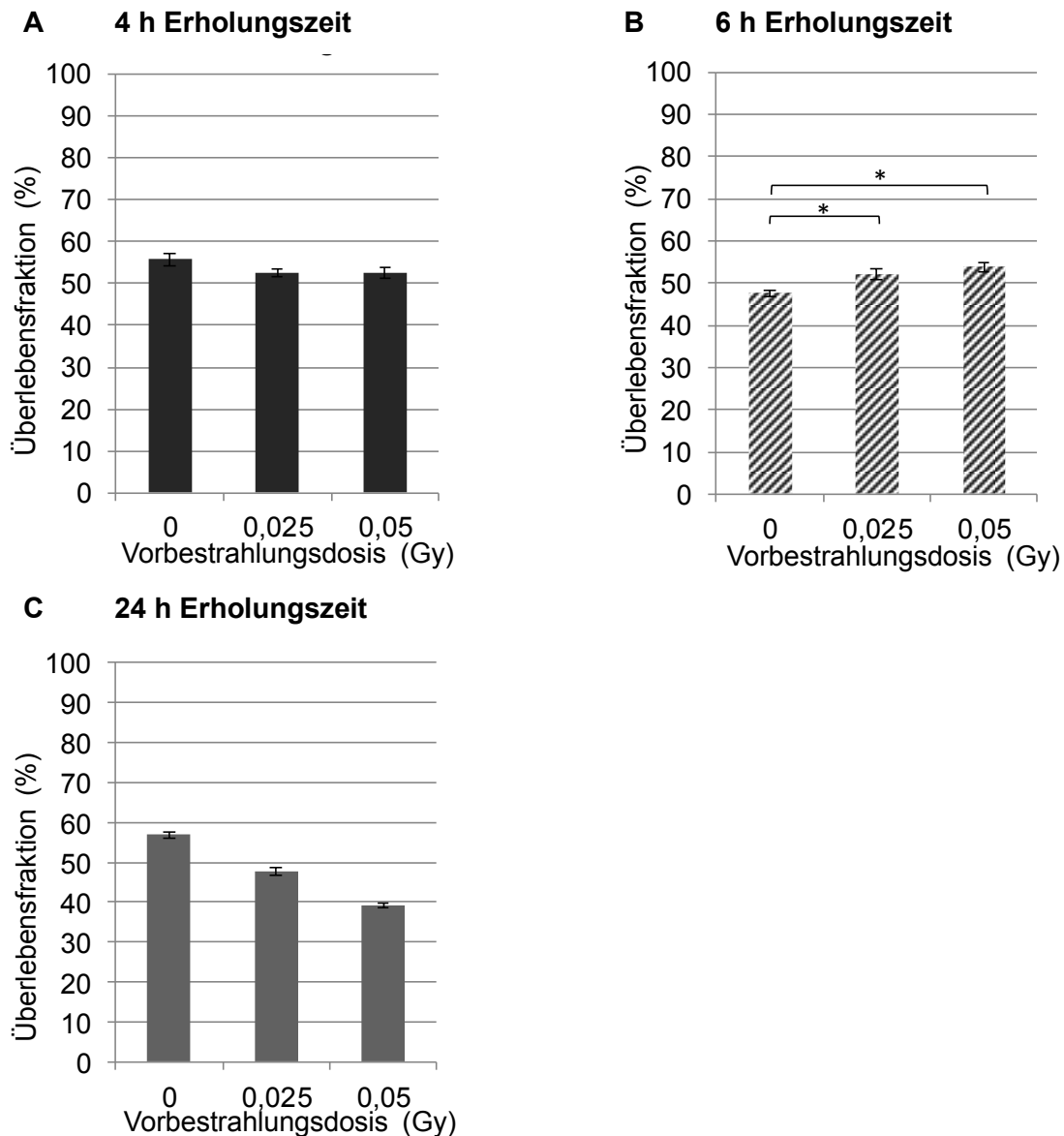


Abb. 10: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der FRTL-5 Zellen in Abhängigkeit von der durch die Röntgenröhre applizierte Vorbestrahlungsdosis. In Bild A wurde nach 4 h, in Bild B nach 6 h und in Bild C nach 24 h mit  $^{99m}\text{Tc}$  (2 Gy) nachbestrahlt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen.

In Abb. 10 sind die Überlebensfraktionen nach Vor- und Nachbestrahlung zu den drei Erholungszeiträumen dargestellt. Nach 4 h Erholungszeit waren die Überlebensfraktionen für die mit 0,025 Gy und 0,05 Gy vorbestrahlten Zellen mit 52,4 % und 52,7 % signifikant geringer, als die der nicht vorbestrahlten Zellen mit 55,8 %. Nach 6 h Erholungszeit war hingegen das Zellüberleben der vorbestrahlten Zellen mit 52,1 % bei 0,025 Gy und 53,8 % bei 0,05 Gy signifikant höher, als das der Zellen, die nur nachbestrahlt wurden. Ihre Überlebensfraktion betrug bei reiner Nachbestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  nur 47,7 %. Nach 24 h war dieser protektiver Effekt nicht mehr zu beobachten, die Überlebensfraktionen der vorbestrahlten Zellen waren mit 47,8 % bei 0,025 Gy und 39,3 % bei 0,05 Gy signifikant kleiner als die der nicht vorbestrahlten Zellen mit 56,9 %. Das Zellüberleben sinkt nach 24 h mit steigender Vorbestrah-

lungsdosis ab. In diesem Versuch konnte die Adaptive Antwort auch bei kombinierter Bestrahlung aus Röntgenstrahlung und  $^{99m}\text{Tc}$  nach 6 h Erholungszeit für zwei Vorbestrahlungsdosen nachgewiesen werden.

### **3.5.2 Nachweis der Adaptiven Antwort bei Vorbestrahlung mit Röntgenstrahlung und Nachbestrahlung mit $^{99m}\text{Tc}$ und Perchlorat**

Die Adaptive Antwort sollte in diesem Versuch durch die Kombination aus einer Vorbestrahlung mit externer Röntgenstrahlung und einer extrazellulären Nachbestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$ , nach Vorinkubation mit Perchlorat, erfolgen. Dazu wurden die am Vortag ausgesäten Zellen in der Röntgenröhre mit 0,025 Gy (14 s) oder 0,05 Gy (26 s) vorbestrahlt (Dosisleistung=0,1235 Gy/min). Die Nachbestrahlung erfolgte nach 4 h; 6 h oder 24 h. Hierzu wurden die Zellen mit Perchlorat bei 37 °C inkubiert, bevor die Aktivität von 500 MBq/2 ml  $^{99m}\text{Tc} + \text{ClO}_4^-$  (entspricht 1 Gy) über eine Stunde appliziert wurde. Nach dem Abwaschen der Aktivität wurden die Zellen entsprechend dem Koloniebildungstest weiterverarbeitet und ausgewertet. Bei diesem Versuch betrug der Uptake bei Zugabe von 0,1 MBq/2 ml nach Vorinkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Perchlorat pro 0,25 Mio. Zellen 0,05 %.

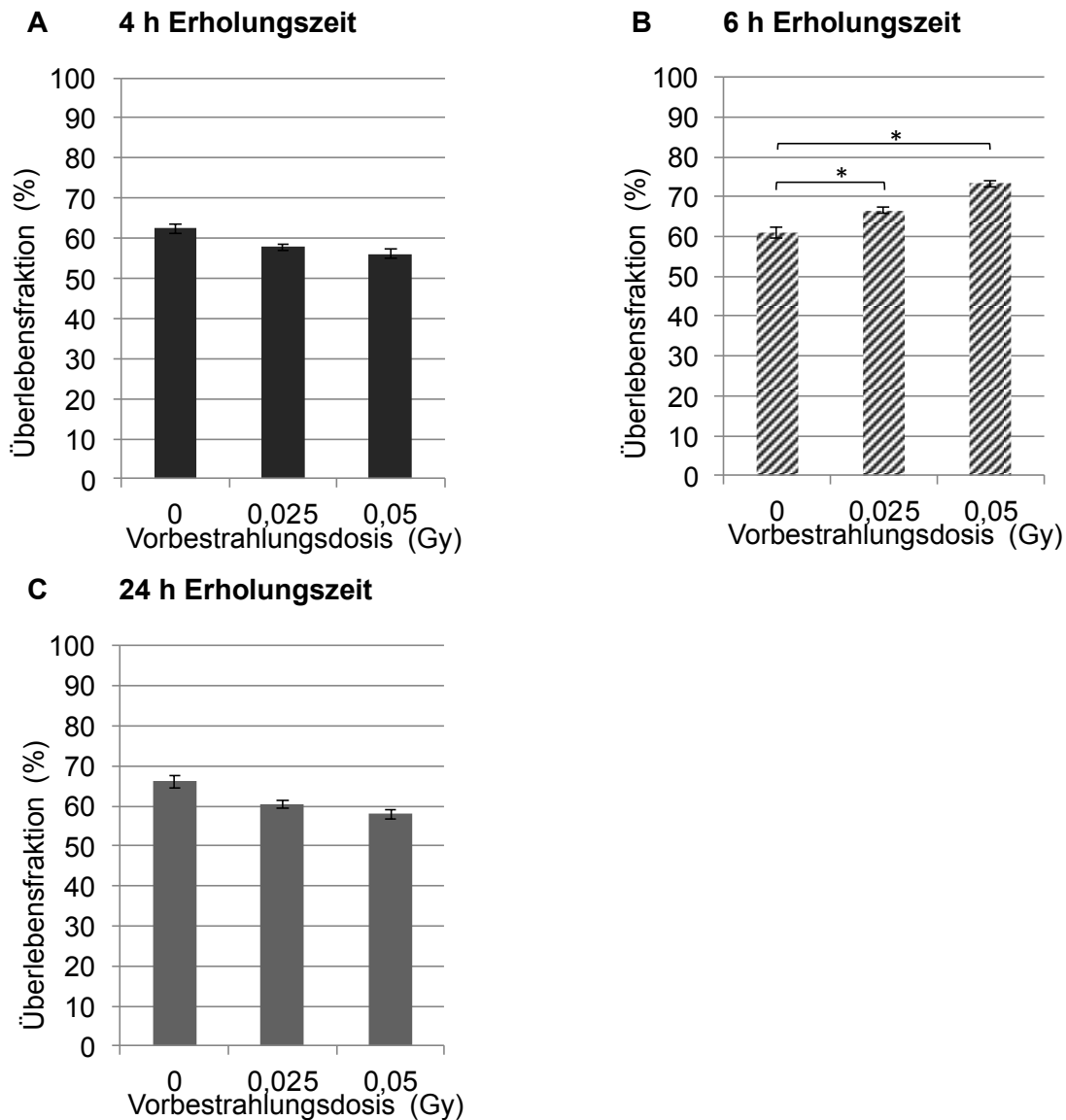


Abb. 11: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der FRTL-5 Zellen in Abhängigkeit von der Vorbestrahlungsdosis (Röntgenstrahlung). In Bild A wurde nach 4 h, in Bild B nach 6 h und in Bild C nach 24 h mit  $^{99m}\text{Tc}$  und Perchlorat (1 Gy) nachbestrahlt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen.

In Abb. 11 ist das Zellüberleben in Abhängigkeit von der Vorbestrahlungsdosis bei den drei unterschiedlichen Erholungszeiten dargestellt. Im Teil A, mit Folgebestrahlung nach 4 h Erholung, sind die Überlebensfraktionen der mit 0,025 Gy und 0,05 Gy vorbestrahlten Proben mit 57,8 % und 56,2 % signifikant geringer als die der nicht vorbestrahlten Probe mit 62,4 % Zellüberleben. Nach 6 h Erholungszeit (Teil B) wurde bei den Vorbestrahlungsdosen 0,025 Gy mit 66,5 % und 0,05 Gy mit 73,4 % ein signifikant höheres Zellüberleben, als bei den nicht vorbestrahlten Zellen (ÜF= 61.1 %) festgestellt. Mit der höheren Vorbestrahlungsdosis von 0,05 Gy konnte hier auch ein größerer protektiver Effekt auf das Zellüberleben beobachtet werden. Dagegen wurde nach 24 h Erholungszeit (Teil C) eine absteigende Überlebensfraktion mit steigender Vorbestrahlungsdosis beobachtet. Zudem war das Zellüberleben bei 0,025 Gy (ÜF= 60,4 %) und 0,05 Gy (ÜF= 58,0 %) Vorbestrahlung signifikant

geringer als das der nicht vorbestrahlten Zellen ( $\bar{U}F = 66\%$ ). Bei der Nachbestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  + Perchlorat nach 6 h Erholungszeit konnte so ebenfalls ein protektiver Effekt durch eine Vorbestrahlung mit der Röntgenröhre (0,025 Gy und 0,05 Gy) nachgewiesen werden.

### **3.5.3 Nachweis der Adaptiven Antwort bei Vorbestrahlung mit $^{99m}\text{Tc}$ und Nachbestrahlung mit der Röntgenstrahlung**

In diesem Versuch soll die Adaptive Antwort durch Vorbestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  und Nachbestrahlung mit der Röntgenröhre nachgewiesen werden. Dazu wurden je 0,25 Mio. Zellen pro Well 24 h nach Aussaat mit 114,3 kBq/2 ml (entspricht 0,025 Gy) und 228,5 kBq/2 ml (entspricht 0,05 Gy)  $^{99m}\text{Tc}$  über eine Stunde vorbestrahlt. Die Nachbestrahlung in der Röntgenröhre erfolgte nach jeweils 4 h; 6 h und 24 h. Um eine Dosis von 2 Gy zu erreichen wurden die Zellen für 1 min und 39 s bestrahlt, dabei betrug die Dosisleistung bei einer Stromstärke von 20 mA 1,235 Gy/min. Danach wurden die Zellen im Koloniebildungstest weiterverarbeitet. In diesem Versuch betrug der Uptake von 0,1 MBq/2 ml  $^{99m}\text{Tc}$  über eine Stunde 1,57 % pro 0,25 Mio. Zellen.



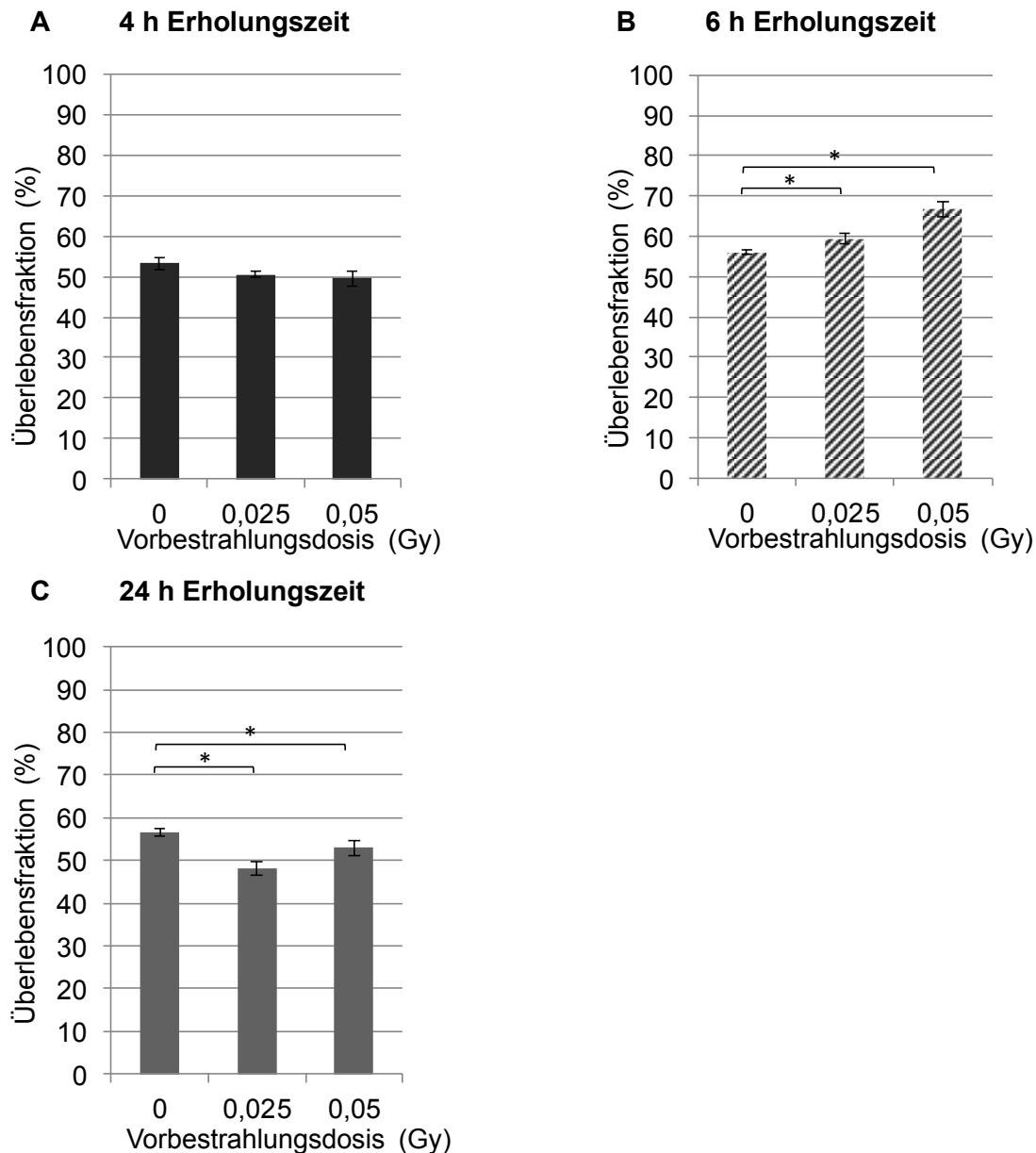


Abb. 12: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der FRTL-5 Zellen in Abhängigkeit von der durch  $^{99m}\text{Tc}$  applizierten Vorbestrahlungsdosis. In Bild A wurde nach 4 h, in Bild B nach 6 h und in Bild C nach 24 h mit der Röntgenröhre (2 Gy) nachbestrahlt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen.

In Abb. 12 sind in Teil A bis C die Überlebensfraktionen der Zellen in Abhängigkeit von der applizierten Vorbestrahlungsdosis dargestellt. Nach 4 h Erholungszeit (Teil A) ist kein protektiver Effekt durch die Vorbestrahlung mit 0,025 Gy oder mit 0,05 Gy erkennbar. Die Überlebensfraktionen sind mit 50,5 % und 49,5 % signifikant geringer als die der nicht vorbestrahlten Probe mit 53,4 % Zellüberleben. Dagegen waren die Überlebensfraktionen der vorbestrahlten Zellen nach 6 h Erholungszeit (Teil B) mit 59,4 % bei 0,025 Gy und 66,7 % bei 0,05 Gy signifikant höher als die der nicht vorbestrahlten Zellen mit 56,1 %. Nach 24 h Erholungszeit (Teil C) ist durch die Vorbestrahlung mit 0,025 Gy (ÜF= 48,0 %) oder 0,05 Gy (ÜF= 52,9 %) kein protektiver Effekt auf die Überlebensfraktion der Zellen mehr zu beobach-

ten. Das Zellüberleben der nicht vorbestrahlten Zellen war mit 56,6 % signifikant höher. Somit konnte auch durch Vorbestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  ein protektiver Effekt auf die Überlebensfraktion nach Zweitbestrahlung durch die Röntgenstrahlung bei 6 h Erholungszeit nachgewiesen werden.

#### **3.5.4 Nachweis der Adaptiven Antwort bei Vorbestrahlung mit $^{99m}\text{Tc}$ und Perchlorat und Nachbestrahlung mit Röntgenstrahlung**

Auch in diesem Versuch sollte eine Adaptive Antwort durch Kombination zweier verschiedener Strahlenqualitäten nachgewiesen werden. Die Vorbestrahlung der am Vortag ausgesäten Zellen erfolgte nach Vorinkubation durch Perchlorat mit 12,5 MBq/2 ml (0,025 Gy) und 25 MBq/2 ml (0,05 Gy)  $^{99m}\text{Tc}$ . Die zweite Bestrahlung erfolgte jeweils nach 4 h; 6 h und 24 h. Dazu wurden die Zellen für eine Dosis von 2 Gy für 1 min 39 s in der Röntgenröhre (Stromstärke=20 mA, Dosisleistung=1,235 Gy/min) bestrahlt. Danach wurden die Zellen im Koloniebildungstest weiterverarbeitet. Der bei diesen Versuchen durchgeführte Uptake von 0,1 Mbq/2 ml betrug bei den mit Perchlorat vorinkubierten Zellen 0,04 % pro 0,25 Mio. Zellen.

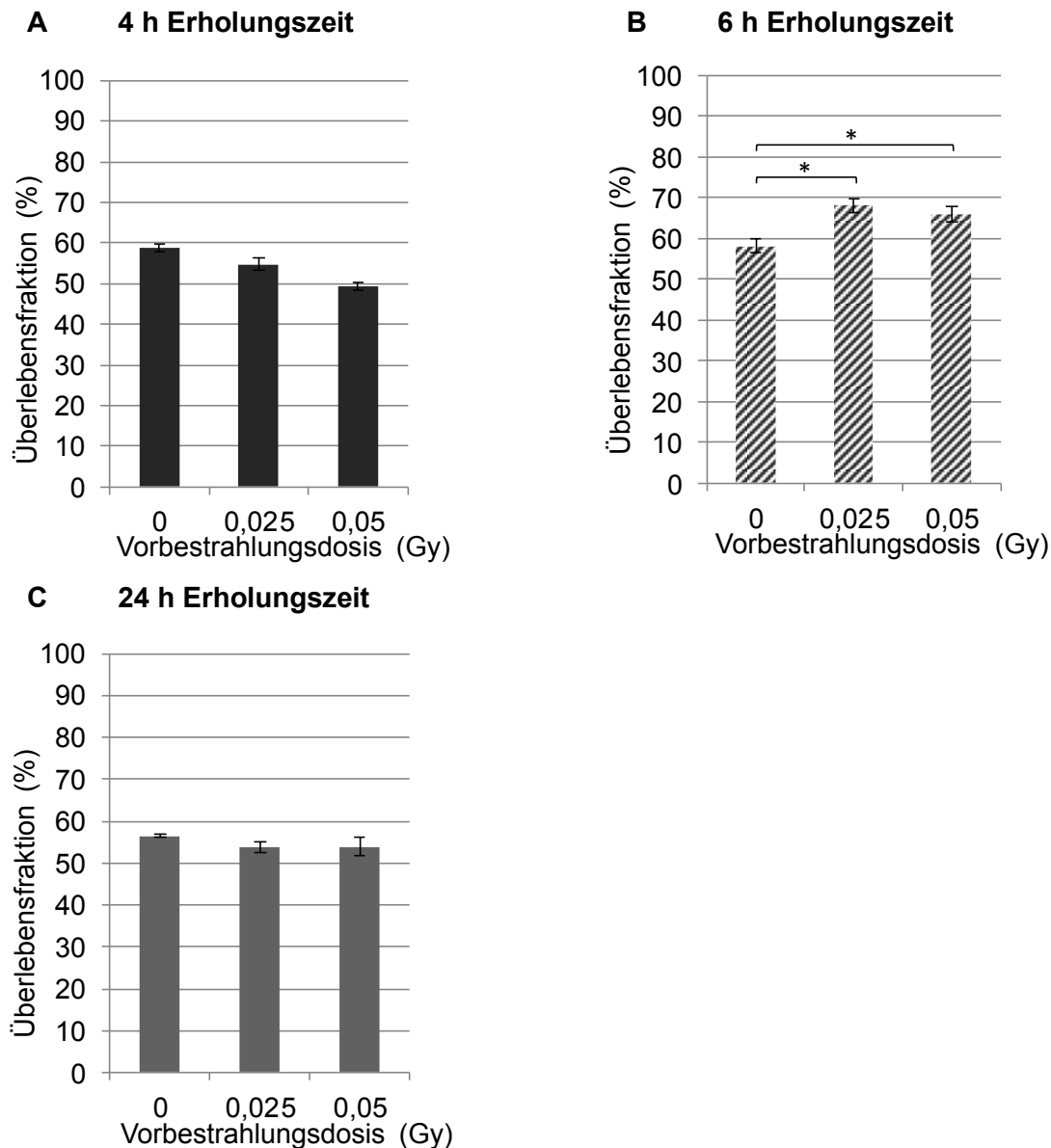


Abb. 13: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der mit Perchlorat vorinkubierten FRTL-5 Zellen in Abhängigkeit von der durch  $^{99m}\text{Tc}$  applizierten Vorbestrahlungsdosis. In Bild A wurde nach 4 h, in Bild B nach 6 h und in Bild C nach 24 h mit der Röntgenröhre (2 Gy) nachbestrahlt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen.

In Abb. 13 sind die Überlebensfraktionen der vor- und nachbestrahlten Zellen in Abhängigkeit von der Vorbestrahlungsdosis dargestellt. Nach 4 h Erholungszeit (Teil A) ergeben sich für die Vorbestrahlungsdosen 0,025 Gy und 0,05 Gy mit 54,8 % und 49,4 % signifikant geringere Überlebensfraktionen als für die nicht vorbestrahlten Zellen mit 58,9 %. Im Teil B dagegen, also nach 6 h Erholungszeit, betrug das Zellüberleben für 0,025 Gy und 0,05 Gy Vorbestrahlung mit 68,1 % und 66,0 % signifikant höhere Werte als für die nicht vorbestrahlten Zellen mit 56,5 %. Die Adaptive Antwort war hier, im Unterschied zu den anderen Versuchen, bei 0,025 Gy Vorbestrahlung signifikant höher als bei 0,05 Gy. Im Teil C, bei 24 h Erholungszeit, war hingegen keine Adaptive Antwort zu beobachten. Das Zellüberleben war

hier mit 53,6 % (0,025 Gy) und 54,0 % (0,05 Gy) signifikant geringer als bei der nicht vorbestrahlten Probe ( $\bar{U}F = 56,5 \%$ ).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit einer Vorbestrahlung von 0,025 Gy und 0,05 Gy durch  $^{99m}\text{Tc}$  und Perchlorat, nach 6 h Erholungszeit und einer Folgebestrahlung mit 2 Gy durch Röntgenstrahlung eine Adaptive Antwort nachweisbar war.

### **3.6 Einfluss der Vorbestrahlung durch Röntgen auf den Uptake von $^{99m}\text{Tc}$ nach 4 h; 6 h; 24 h Erholungszeit**

In diesem Versuch sollte ermittelt werden, ob eine Vorbestrahlung durch die Röntgenstrahlung den Uptake von  $^{99m}\text{Tc}$  verändert. Somit ließe sich der Effekt der Adaptiven Antwort mit einer verminderten intrazellulären  $^{99m}\text{Tc}$ -Aufnahme bei vorbestrahlten Zellen erklären. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit 0,05 Gy in der Röntgenröhre vorbestrahlt und nach 4 h; 6 h und 24 h nachbestrahlt. Die Nachbestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  erfolgte nach Vorinkubation mit Perchlorat mit 500 MBq/2 ml (1 Gy) oder ohne Perchlorat mit 9,14 MBq/2 ml (2 Gy). Nach einer Stunde Bestrahlungszeit wurde der Uptake bestimmt und auf 0,25 Mio. Zellen bezogen. Im Folgenden wird jeweils der Uptake der nicht vorbestrahlten mit dem der vorbestrahlten Probe verglichen.

Außerdem wurde jeweils nach 4 h; 6 h und 24 h ein Uptake mit der Tracermenge 0,1 MBq/2 ml mit und ohne Perchlorat durchgeführt. Der Uptake ohne Perchlorat lag bei den Versuchen zwischen 1,42-1,81 % pro 0,25 Mio. Zellen. Nach Vorinkubation mit Perchlorat wurde Uptakes von 0,05-0,18 % pro 0,25 Mio. Zellen gemessen. Diese Werte liegen im Rahmen der Uptakemengen aller übrigen Experimente.

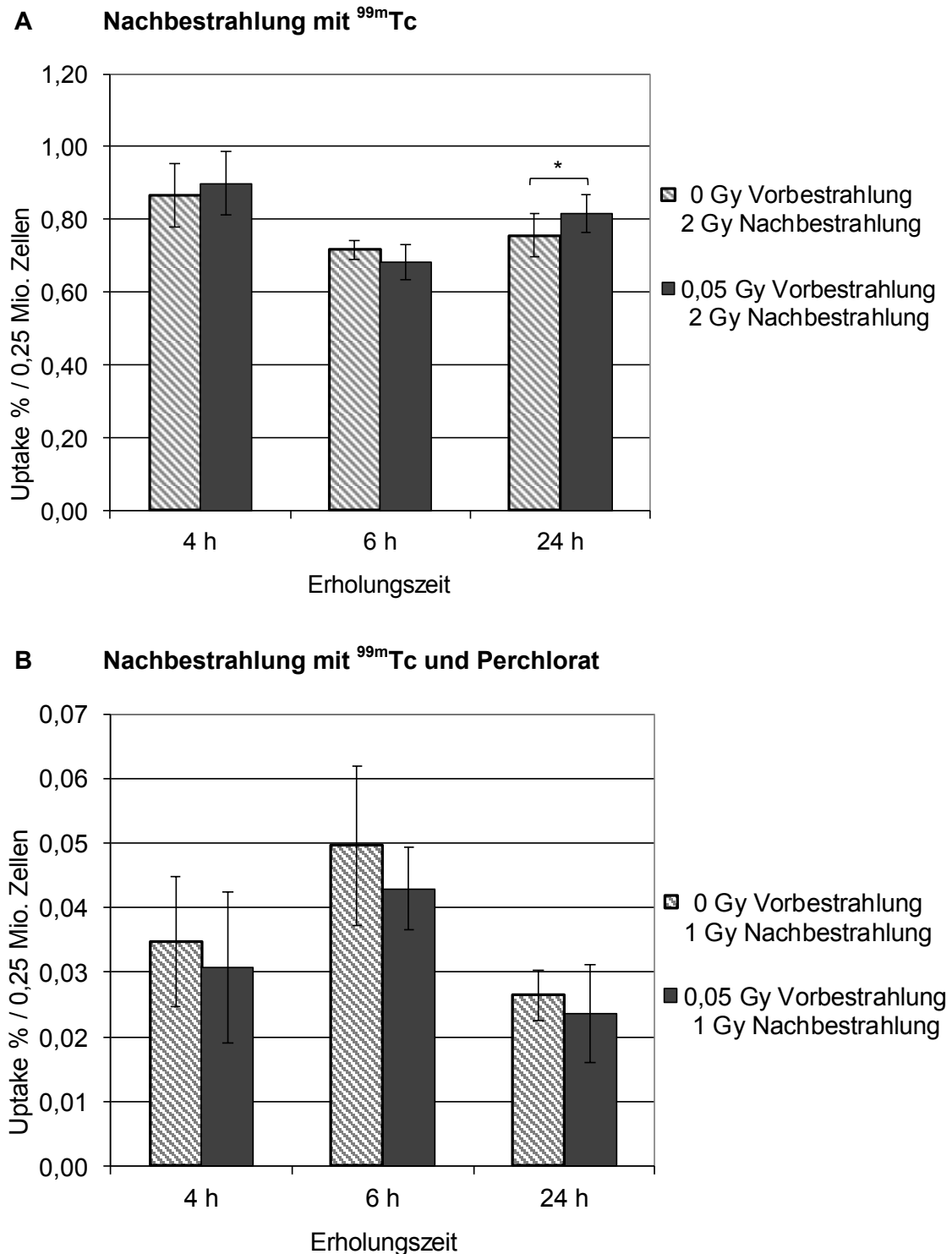


Abb. 14: Dargestellt ist der Uptake pro 0,25 Mio. FRTL-5 Zellen in Abhängigkeit von der durch die Röntgenröhre applizierten Vorbestrahlungsdosis nach 4 h; 6 h und 24 h Erholungszeit. In Bild A wurde mit 9,14 MBq/2 ml  $^{99m}\text{Tc}$  und in Bild B mit 500 MBq/2 ml  $^{99m}\text{Tc}$  und Perchlorat nachbestrahlt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und signifikante (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Proben.

In Abb. 14 Bild A lässt sich nach 4 h und 6 h kein signifikanter Unterschied zwischen den Uptakes der vorbestrahlten und denen der nachbestrahlten Zellen nachweisen. Erst 24 h

nach der Vorbestrahlung ist der Uptake der vorbestrahlten Zellen mit 0,82 %/0,25 Mio. Zellen höher als der der unvorbestrahlten Zellen mit 0,76 %/0,25 Mio. Zellen.

In Bild B der Abb. 14 sind die Zellen nach Vorinkubation mit Perchlorat mit 500 MBq/2 ml  $^{99m}\text{Tc}$  nachbestrahlt worden. Zu keinem der Zeitpunkte ist hier ein signifikanter Unterschied der Uptakes nachweisbar.

Somit konnte ausgeschlossen werden, dass der Uptake Einfluss auf die Adaptive Antwort hatte.

## 4 Diskussion

Die Adaptive Antwort bezeichnet einen strahlenbiologischen Effekt, bei dem Zellen die mit einer niedrigen Dosis ionisierender Strahlung vorbehandelt wurden, auf eine hohe Strahledosis mit weniger Zellschäden reagieren, als nicht vorbestrahlte Zellen. Dieser protektive Effekt der Vorbestrahlung ist jeweils nur in einem begrenzten Zeitfenster nachweisbar. Bereits 1984 gelang es Olivieri (Olivieri, et al., 1984), mit Hilfe der kombinierten Bestrahlung von Lymphozyten durch  $^3\text{H}$ -Thymidin und Röntgenstrahlung eine Adaptive Antwort nachzuweisen. Das höhere Überleben vorbehandelter Zellen im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen ist seitdem vor allem mit externen Strahlenquellen (Röntgenstrahlung,  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{60}\text{Co}$ ) untersucht worden. Dabei wurden verschiedenste Methoden zur Detektion von Strahlenschäden verwendet. Auch mittels anderer Noxen konnte der beschriebene Effekt nachgewiesen werden (Mohankumar, et al., 2000; Assis, et al., 2002; Schlade-Bartusiak, et al., 2002). Untersuchungen der Adaptiven Antwort mit offenen Radionukliden wurden dagegen kaum publiziert. Eine strukturierte Untersuchung der Adaptiven Antwort, ausgelöst durch Bestrahlung mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  und  $^{188}\text{Re}$  vergleichend zur Röntgenstrahlung wurde 2010 in der Nuklearmedizin Dresden (Wendisch, 2010) durchgeführt. Es wurde dabei nachgewiesen, dass die Art der zellulären Schädigung, die intrazelluläre Radionuklid Aufnahme, die Höhe der Vorbestrahlungsdosis und die Erholungszeit zwischen den Bestrahlungen die Ausbildung der Adaptiven Antwort beeinflussen. Es wurde bei Vor- und Nachbestrahlung jeweils die gleiche Strahlungsmodalität verwendet.

In dieser Arbeit wurde dagegen untersucht, ob auch durch Kombination der unterschiedlichen Strahlenqualitäten von  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  und Röntgenstrahlung die Adaptive Antwort nachgewiesen werden kann. Die unterschiedlichen Strahlenqualitäten sind von Bedeutung, weil sie unterschiedlich komplexe Strahlenschäden verursachen könnten.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  emittiert nicht nur Gammastrahlung, sondern auch niederenergetische Elektronen geringer Reichweite. Diese könnten bei zellulärer Aufnahme des Radionuklids andere Schäden verursachen als die durchdringende Röntgenstrahlung. Darüber hinaus verursachen die niederenergetischen Elektronen intrazellulär eine inhomogene Dosisverteilung, was im Gegensatz zur Röntgenstrahlung steht, die eine homogene Dosis deponiert. Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluss die intrazelluläre Aufnahme von  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  über den NIS-Transporter der FRTL-5 Zellen auf die Ausbildung der Adaptiven Antwort hat. Mittels Koloniebildungstest wurde das Zellüberleben beurteilt und als Einflussfaktoren wurden die Vorbestrahlungsdosis und die Erholungszeit variiert. Um in Voruntersuchungen die Vergleichbarkeit zu testen, wurde die Adaptive Antwort zunächst durch zweimalige Bestrahlung mit der gleichen Strahlenqualität durchgeführt, bevor diese variiert wurden. Als Grundlage der Untersuchungen wurde die Toxizität

der Strahlung auf die FRTL-5 Zellen mithilfe von Dosiswirkungskurven eruiert. Bei Verwendung von  $^{99m}\text{Tc}$  wurde stets der Uptake mitbestimmt, da die Menge des intrazellulären  $^{99m}\text{Tc}$  wesentlichen Einfluss auf die Dosis und somit auf das Ausmaß der Zellschädigung hat.

#### 4.1 Dosis-Wirkungsbeziehungen bei Bestrahlung von FRTL-5 Zellen

Als biologischer Endpunkt wurde der Koloniebildungstest (Munshi, et al., 2005) gewählt, der das klonogene Überleben der Zellen nach Bestrahlung untersucht. Diese auch reproduktive Integrität genannte Fähigkeit wurde als Methode verwendet, da in der Strahlenbiologie die unbegrenzte Teilungsfähigkeit von Tumorzellen einen entscheidenden Ansatz für Therapiemöglichkeiten darstellt.

##### 4.1.1 Klonogenes Überleben nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung

Bei Strahlungsarten mit einem niedrigen LET, wie der Röntgenstrahlung, stellt sich bei halb-logarithmischer Darstellung eine Dosiswirkungskurve als typische Schulterkurve dar. Bei kleinen Dosen zeigt die DWK eine Schulter, bei höheren Dosen geht die Kurve in einen annähernd exponentiellen Verlauf über. Die Ausprägung der Schulter wird durch das Verhältnis  $\alpha/\beta$  bestimmt. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der linearen und quadratischen Komponenten  $\alpha$  und  $\beta$  konnten noch nicht abschließend bestimmt werden (Bodgi, et al., 2016). Eine Hypothese geht davon aus, dass die lineare Komponente  $\alpha$  die durch Einzelereignisse (einzelnes Sekundärelektron) verursachten Doppelstrangbrüche (DSB) repräsentiert, während  $\beta$  für den Anteil der kumulativen Strahlenschäden (DSB durch mind. 2 Sekundärelektronen, die unabhängig voneinander entstehen) steht (Kellerer and Rossi, 1973). Die Mechanismen der Interaktion zwischen den Ereignissen werden noch diskutiert. Chadwick und Leenhouts et al. postulierten, dass  $\alpha$  für einen letalen DSB steht, während  $\beta$  zwei subletale ESB (Einzelstrangbrüche) auf den gegenüberliegenden DNA-Strängen repräsentiert (Chadwick and Leenhouts, 1973). Das Verhältnis  $\alpha/\beta$  bestimmt die Dosis, bei der der Anteil beider Komponenten am gesamten Zellschaden gleich ist. Diese Dosis liegt bei 3-10 Gy (Franken, et al., 2013). In den hier durchgeführten Versuchen betrug  $\alpha/\beta$  bei Röntgenstrahlung 10,8 Gy. Die DWK in Abb. 2 zeigt eine Schulterkurve. Dies deutet auf einen exponentiellen (in der halb-logarithmischen Darstellung linearen) Zusammenhang zwischen Dosis und Zellüberleben hin.

In den beiden Überlebenskurven der Abb. 2 (Röntgen, Röntgen+Perchlorat) fällt weiterhin ein Abfall der ÜF beim Dosispunkt 1 Gy auf. Es ist anzunehmen, dass der beobachtete Abfall der Überlebensfraktion lediglich einer Abweichung der Messwerte vom wahren Wert entspricht, dem kein strahlenbiologischer Effekt zugrunde liegt. Die sogenannte low-dose Hyperradiosensitivity (HRS) beschreibt eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit im Niedrigdosisbereich. Dabei sind die Überlebensfraktionen geringer, als sie dem Linearquadratischem Mo-



dell nach erwartet worden wären. Es ist beschrieben, dass bestimmte Reparaturprozesse erst ab einem gewissen Schadensniveau aktiviert werden (Murray and McEwan, 2007). Im Allgemeinen sind die Strahlendosen, die einen solchen Effekt auslösen, jedoch deutlich geringer (0,1-0,5 Gy) (Marples and Collis, 2008).

Wie zu erwarten war, hatte die Zugabe von Perchlorat vor der Röntgenbestrahlung keinen zusätzlichen Einfluss auf das Zellüberleben.

#### **4.1.2 Klonogenes Überleben nach Bestrahlung mit $^{99m}\text{Tc} \pm$ Perchlorat**

Auch für die Bestrahlungen mit  $^{99m}\text{Tc}$  wurden mittels Koloniebildungstest Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Im Gegensatz zu den Überlebenskurven nach Röntgenstrahlung ist keine Schulterkurve zu erkennen. Die Kurvenanpassung wurde mit einer monoexponentiellen Funktion durchgeführt. Das Linearquadratische Modell wurde nicht angewandt, da eine lineare Abhängigkeit vorliegt. Die Zellen, die ohne Perchlorat-Vorinkubation mit  $^{99m}\text{Tc}$  bestrahlt wurden, zeigten einen steileren Abfall der ÜF im Vergleich zu  $^{99m}\text{Tc}$  mit Perchlorat. Dies belegt, dass durch die intrazelluläre Aufnahme des  $^{99m}\text{Tc}$ , bei gleicher Aktivitätskonzentration, schneller letale Strahlendosen erreicht werden. Diese höhere radiotoxische Wirkung durch die Dosissteigerung ist zum Teil durch die niederenergetischen Auger-Elektronen bedingt (Freundenberg, et al., 2012). Deren durch den hohen LET bedingte Strahlenletalität wird durch die geringe Reichweite erst in unmittelbarer Nähe des  $^{99m}\text{Tc}$  zum Zellkern wirksam.

Durch die Blockade des NIS (mit einem  $^{99m}\text{Tc}$ -Uptake von nur 0,04 %) konnte das Zellüberleben bei einer nahezu ausschließlich extrazellulären Bestrahlung untersucht werden. Dies ermöglicht den Vergleich der Wirkung von  $^{99m}\text{Tc}$  zur Bestrahlung mit Röntgenstrahlung.

#### **4.1.3 Vergleich der Strahlenqualitäten**

Um die Strahlenqualitäten vergleichen zu können, mussten zunächst vergleichbare Dosen berechnet werden.  $^{99m}\text{Tc}$  kann über den NIS in die Zellen aufgenommen werden. Durch die intrazellulär wirksame Aktivität kommt es zu einer Dosissteigerung um den Faktor 100. Zur Dosisberechnung wurde das MIRD-Modell verwendet. Mit der berechneten Dosis von 10,94 Gy bei einer applizierten Aktivitätsmenge von 50 MBq/2 ml  $^{99m}\text{Tc}$  (über 1 h) wurde so bereits die maximale durch Röntgenstrahlen untersuchte Dosis von 10 Gy überschritten. Auf der anderen Seite konnte nach Inkubation mit Perchlorat durch Zugabe von 200 MBq/2 ml  $^{99m}\text{Tc}$  über 1 h nur eine maximale Dosis von 0,4 Gy erreicht werden. So ist ein Vergleich der  $D_{37}$  unter diesen Versuchsbedingungen nicht möglich.

Die für die adaptiven Antworten verwendeten Dosen von 0,025 Gy; 0,05 Gy; 1 Gy und 2 Gy riefen jedoch in den durchgeführten Versuchen vergleichbare Überlebensfraktionen hervor, sodass die durchgeführten Dosimetrie-Berechnungen durchaus auf die Bestrahlungsbedingungen anwendbar erscheinen.

## 4.2 Untersuchung der Adaptiven Antwort

Ziel war es, in dieser Arbeit die Adaptive Antwort mittels Koloniebildungstest nach zweimaliger Bestrahlung durch Röntgenstrahlung,  $^{99m}\text{Tc}$  und Perchlorat und  $^{99m}\text{Tc}$  nachzuweisen. Dabei wurde die Kombination der Strahlenqualitäten variiert. Die Ergebnisse sollen im Hinblick auf abhängige Faktoren wie die Zelllinie, den gewählten biologischen Endpunkt, die Vorbestrahlungsdosis und die Erholungszeit diskutiert werden.

### 4.2.1 Biologische Systeme

Erstmalig gelang der Nachweis einer Adaptiven Antwort an humanen Lymphozyten (Olivieri, et al., 1984). Weitere aktuelle Untersuchungen wurden durch Bestrahlung von Lymphozyten durchgeführt (Wolff, et al., 1988; Wojcik, et al., 1996; Sannino, et al., 2014) die teilweise aus Patientenproben nach diagnostischen Bestrahlungen (Monsieurs, et al., 2000) oder nach anderweitigen Strahlenexpositionen (Gajendiran, et al., 2001) gewonnen wurden.

Einige Untersuchungen konzentrierten sich auf den Vergleich zwischen benignen und malignen Zelllinien (Schwarz, et al., 2008). In diesen Versuchen zeigten die benignen Zellen eine Adaptive Antwort, während maligne Zellen auf eine niedrige Vorbestrahlungsdosis mit einem verminderten Zellüberleben reagierten. Die Autoren erklären sich die Reaktion der malignen Zellen mit dem Phänomen der low-dose Hyperradiosensitivity (HRS). Daraus folgend wurde diskutiert, in den Bestrahlungsprotokollen der Tumortherapie niedrigdosierte Vorbestrahlungsdosen einzuführen. Die Überlegung war, die Zellen des umgebenden Normalgewebes zu schonen, in dem diese, im Gegensatz zu den Tumorzellen, nach der folgenden hohen Dosis eine Adaptive Antwort ausbilden. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die Adaptive Antwort auf diese Weise in der Strahlentherapie Anwendung finden kann, denn insgesamt gelang der Nachweis einer Adaptiven Antwort bei einer Vielzahl eukaryotischer Zellen, sowohl in malignen (Grđina, et al., 2013) als auch in benignen Zelllinien (Pan, et al.; Raaphorst and Boyden, 1999; Liu, et al., 2012).

Es wurde nachgewiesen, dass auch Bakterien wie E.coli eine Adaptive Antwort ausbilden können (Assis, et al., 2002). Andere Arbeitsgruppen arbeiteten erfolgreich in vivo mit Mäusen (Ito, et al., 2007; Wang, et al., 2010; Cao, et al., 2011), Fröschen (Audette-Stuart, et al., 2011) oder Zebrafischembryos (Choi, et al., 2010).

Die Adaptive Antwort wurde in unseren Versuchen in vitro an Rattenschilddrüsenzellen (FRTL-5) nachgewiesen. Ein Subklon von FRTL-5, die Rattenschilddrüsen-Zelllinie PC Cl3, wurde bereits 2010 an der Klinik für Nuklearmedizin Dresden verwendet (Wendisch, 2010). Diese beiden Zelllinien eignen sich besonders gut für die Arbeit mit  $^{99m}\text{Tc}$ , da durch den vorhandenen NIS sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Bestrahlungen möglich sind.

#### 4.2.2 Biologischer Endpunkt

In dieser Arbeit wurde, wie in vielen anderen Arbeiten (Schaffer, et al., 2004; Fan, et al., 2007), das Zellüberleben im Koloniebildungstest als biologischer Endpunkt gewählt. Der gemessene Verlust der reproduktiven Integrität ist sehr gut geeignet um die intrinsische Strahlenwirkung der Zellen in vitro zu beurteilen (Munshi, et al., 2005). Die strahlenbiologische Standardmethode ermöglicht es, Rückschlüsse auf Strahlenwirkungen, zum Beispiel in der Tumorthherapie, zu ziehen. Andere Arbeitsgruppen wiesen die Adaptive Antwort dagegen anhand der DNA-Schädigung mit dem Komet Assay (Ikushima, et al., 1996; Gajendiran, et al., 2001), der Anzahl von Chromosomenschäden mittels Mikrokerntest (micronucleus assay) (Pan, et al.; Monsieurs, et al., 2000; Sannino, et al., 2014) oder Chromosomenaberrationen (chromatid-breaks) (Seong, et al., 1995) nach. Alle Methoden eigneten sich zum Nachweis der Adaptiven Antwort. In weiteren Studien wurden höhere DNA-Reparatur-Raten mittels UDS-Test (Mohankumar, et al., 2000), eine erhöhte Zellviabilität mittels WST-1-Assay (Schwarz, et al., 2008), geringere Mutationsraten (Vares, et al., 2011) und verminderte Apoptoseraten mittels der TUNEL-Methode (Choi, et al., 2010; Grdina, et al., 2013) belegt.

#### 4.2.3 Einfluss der Vorbestrahlungsdosis auf die Adaptive Antwort

In dieser Arbeit wurden die Vorbestrahlungsdosen von 0,025-0,75 Gy mit Röntgenstrahlung getestet. Der Nachweis der Adaptiven Antwort gelang mit den niedrigsten Vorbestrahlungsdosen von 0,025 Gy und 0,05 Gy mit jeweils 2 Gy Nachbestrahlung.

Bei  $^{99m}\text{Tc}$  konnte bei extrazellulärer Bestrahlung (Modulation mit Perchlorat) und nach intrazellulärer Bestrahlung die Adaptive Antwort bei einem etwas größeren Dosisfenster der Vorbestrahlungsdosis ( $^{99m}\text{Tc}+\text{PCI}$ : 0,01-0,075 Gy;  $^{99m}\text{Tc}$ : 0,025-0,075 Gy) nachgewiesen werden.

Die höchste Adaptive Antwort wurde übereinstimmend durch Vorbestrahlung mit Röntgen,  $^{99m}\text{Tc}+\text{PCI}$  und  $^{99m}\text{Tc}$  bei einer Dosis von 0,05 Gy erzielt.

Ob die Höhe der Adaptiven Antwort abhängig von der Höhe der Vorbestrahlungsdosis ist, wird in der Literatur derzeit noch diskutiert. In einigen Studien wurde die Adaptive Antwort umso größer, je kleiner die eingesetzte Vorbestrahlungsdosis war (Cai and Liu, 1990; Stoilov, et al., 2007). Bei den Untersuchungen von Broome et al. wurde gezeigt, dass sich durch Variation der Vorbestrahlungsdosis keine Veränderung der Höhe der Adaptiven Antwort ergab (Broome, et al., 2002). Dagegen haben andere Arbeitsgruppen (Schaffer, et al., 2004; Schwarz, et al., 2008) bei niedrigeren Vorbestrahlungsdosen ein vermindertes Überleben beobachtet. Es wird angenommen, dass ein Mindestmaß an Strahlenschäden in einer Zelle induziert werden muss, um in dieser eine erhöhte Radioresistenz hervorzurufen. Unter-

halb dieser Dosis kommt es durch die HRS bei kleinen Bestrahlungsdosen zum Abfall der Überlebensrate.

In den eigenen Experimenten erbrachten die höheren Vorbestrahlungsdosen von 0,1-0,75 Gy kein gesteigertes Überleben. In der Literatur gibt es viele Arbeiten, die mit ähnlichen Vorbestrahlungsdosen Erfolg hatten (Seong, et al., 1995; Ikushima, et al., 1996; Ito, et al., 2007). Im Gegensatz zu eigenen Ergebnissen wurden jedoch bei vergleichbaren Bedingungen (Zelllinie, Strahlenart, Erholungszeit) auch höhere Vorbestrahlungsdosen von 0,1 Gy (Fan, et al., 2007; Vares, et al., 2011) oder 0,5 Gy (Kilemade, et al., 2008) zum erfolgreichen Nachweis einer Adaptiven Antwort eingesetzt.

Es wird angenommen, dass es eine Dosisobergrenze gibt, ab der eine Vorbestrahlung keinen protektiven, sondern einen schädigenden Effekt auf die Wirkung der Folgebstrahlung hat (Mitchel, 2010). Je nach Zelllinie, Bestrahlungsmodus, Nachbestrahlungsdosis, biologischem Endpunkt und vielen weiteren Faktoren variiert dieser Grenzwert. Es konnte gezeigt werden, dass hohe Vorbestrahlungsdosen nur bei niedriger Dosisleistung eine Adaptive Antwort hervorrufen können (Shadley and Wiencke, 1989; Elmore, et al., 2008). Auch in dieser Arbeit wurde die Vorbestrahlung mittels Röntgen mit einer niedrigen Dosisleistung von 0,1245 Gy/min durchgeführt.

#### **4.2.4 Einfluss der Erholungszeit auf die Adaptive Antwort**

Bei den durchgeführten Versuchen ließ sich die Adaptive Antwort durch zweimalige Bestrahlung mit Röntgenstrahlung und einem Intervall von 6 h und 8 h nachweisen, während nach zweimaliger Bestrahlung durch  $^{99m}\text{Tc}$  (mit oder ohne Perchloratvorinkubation) jeweils nur bei einer Erholungszeit von 6 h erhöhte Überlebensraten erreicht wurden. Viele andere Arbeitsgruppen hatten mit ähnlichen Intervallen von 4-6 h Erfolg (Fan, et al., 2007; Schwarz, et al., 2008; Vares, et al., 2011). Es gibt Versuche (Morales-Ramirez and Mendiola-Cruz, 2004) bei denen gezeigt wurde, dass das Ausmaß der Adaptiven Antwort bis zu einem gewissen Zeitpunkt nach der Vorbestrahlung ( $^{137}\text{Cs}$  Gammastrahlung) ansteigt (hier 5 h), und danach wieder abfällt (18 h). Im Gegensatz hierzu und zu unseren Ergebnissen gelang der Nachweis in einigen Versuchsreihen jedoch über einen längeren Zeitraum von 24-72 h (Seong, et al., 1995; Kilemade, et al., 2008). Gründe hierfür könnten unterschiedliche Versuchsbedingungen (Zelllinie, Strahlenart, biologischer Endpunkt, Vor- und Nachbestrahlungsdosis) sein. Andererseits könnte es verschiedene, voneinander unabhängige Zellmechanismen geben, die entweder eine frühe oder eine späte Adaptive Antwort induzieren.

#### **4.2.5 Einfluss der Strahlenqualität auf die Adaptive Antwort**

Der größte Teil der Studien zur Adaptiven Antwort nutzte die Röntgenstrahlung (Wolff, 1996; Stoilov, et al., 2007) oder Gammastrahlung unterschiedlicher Quellen wie  $^{137}\text{Cs}$  (Gajendiran,

et al., 2001) oder  $^{60}\text{Co}$  (Kilemade, et al., 2008). Auch in dieser Arbeit wurde Röntgenstrahlung erfolgreich zur Induktion einer erhöhten Strahlenresistenz eingesetzt. Offene Radionuklide wurden hingegen eher selten verwendet. Als Beispiel kann Olivieri et al. genannt werden, dem der Nachweis einer Adaptiven Antwort mithilfe einer Vorbestrahlung von radioaktiv markiertem [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin gelang (Olivieri, et al., 1984). Indem Monsieurs et al. das Blut von mit  $^{131}\text{I}$  behandelten Patienten verwendete, wurden auch hier offene Radionuklide zur Vorbestrahlung eingesetzt (Monsieurs, et al., 2000). Die Nachbestrahlung erfolgte in vitro durch Gammastrahlung. Wendisch et al. konnte die Adaptive Antwort durch zweimalige Bestrahlung mit  $^{188}\text{Re}$  nachweisen, während keine Adaptive Antwort durch die Bestrahlung mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  gelang (Wendisch, 2010). In der vorliegenden Arbeit gelang dagegen der Nachweis der Adaptiven Antwort mit zweimaliger Bestrahlung durch  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  mit und ohne Perchlorat-Vorinkubation. Weiterhin wurde  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (mit und ohne Perchlorat-Vorinkubation) mit Röntgenstrahlung kombiniert. Dabei konnte in allen Variationen (Vorbestrahlung mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  +/- Perchlorat und Nachbestrahlung mit Röntgen, Vorbestrahlung mit Röntgen und Nachbestrahlung mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  +/- Perchlorat) eine Adaptive Antwort nachgewiesen werden. In anderen Versuchen konnte gezeigt werden, dass auch Zellen, die mit Protonen (Choi, et al., 2010), Neutronen (Gajendiran, et al., 2001), alpha-Partikeln (Choi, et al., 2013), Cadmium Chlorid (Pan, et al.; Choi, et al., 2013), Chemotherapeutika (Schlade-Bartusiak, et al., 2002), UV-Strahlung (Mohankumar, et al., 2000), Wasserstoffperoxid (Assis, et al., 2002) oder Schwerionenstrahlung (Wang, et al., 2010; Vares, et al., 2011) behandelt wurden, eine Adaptive Antwort ausbilden können. Dies legt nahe, dass nicht die Strahlenqualität, sondern vielmehr deren Dosis, die Radikal-vermittelte Wirkung und die weiteren Versuchsbedingungen (biologisches System, Erholungszeit) ausschlaggebend für die Ausbildung einer Adaptiven Antwort sind.

### 4.3 Variation unterschiedlicher Strahlenqualitäten

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Kombination gleicher Strahlenqualitäten diskutiert. Desweiteren wurden Röntgen,  $^{99\text{m}}\text{Tc}+\text{PCI}$  und  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  variiert, um eine Adaptive Antwort nachzuweisen. Dabei gelang in allen Kombinationen mit 0,025 Gy und 0,05 Gy Vorbestrahlungsdosis und nach 6 h Erholungszeit der Nachweis eines gesteigerten Überlebens nach der Folgebestrahlung. Die Nachbestrahlungsdosis betrug für Röntgen und  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  2 Gy und aus strahlenhygienischen Gründen bei  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  und Perchlorat 1 Gy. Auffallend ist, dass das Ausmaß der Adaptiven Antwort bei den Versuchen mit 0,05 Gy Vorbestrahlung größer ist, als bei 0,025 Gy Vorbestrahlung (Abb. 10, Abb. 11, Abb. 12). Lediglich bei Vorbestrahlung durch  $^{99\text{m}}\text{Tc}+\text{PCI}$  und Nachbestrahlung mit Röntgenstrahlung war die Adaptive Antwort durch 0,025 Gy größer als durch 0,05 Gy Vorbestrahlung (Abb. 13). Insgesamt zeichnet sich

in den vorliegenden Experimenten ab, dass die Höhe der Adaptiven Antwort von der Vorbestrahlungsdosis abhängig ist.

Auch anderen Arbeitsgruppen gelang der Nachweis der Adaptiven Antwort mit kombinierten Strahlenqualitäten. Monsieur et al. führte bei mit  $^{131}\text{I}$  vorbehandeltem Patientenblut eine Nachbestrahlung mit  $^{60}\text{Co}$  Gammastrahlung durch (Monsieurs, et al., 2000) und konnte bei einem Teil der Versuche eine Adaptive Antwort nachweisen. In diesem Experiment gab es jedoch bei relativ kleiner Fallzahl eine große interindividuelle Variabilität.

In den Versuchen von Vares et al. wurde die Adaptive Antwort durch Vorbestrahlung mit Röntgenstrahlung und Folgebestrahlung durch Schwerionenstrahlung (Kohlenstoff- und Neonionen) nachgewiesen (Vares, et al., 2011). Da Schwerionenstrahlung zu der Hoch-LET-Strahlung gehört, beweist dies, dass eine Niedrigdosisbestrahlung (mit niedrigem LET) auch vor Hoch-LET-Strahlung schützt. Auch bei der Bestrahlung durch  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  können die emittierten Auger-Elektronen Hoch-LET-Strahlung freisetzen. Mit den durchgeführten Versuchen konnten somit nicht nur die Ergebnisse von Vares et al. und Wang et al. (Wang, et al., 2010) bestätigt werden, es wurde zudem nachgewiesen, dass auch bei Beteiligung von Hoch-LET Strahlung eine Adaptive Antwort induziert werden kann. Dies gelang auch Choi et al., die Protonenstrahlung als Vorbestrahlung einsetzten (Choi, et al., 2010).

Einer anderen Arbeitsgruppe gelang es, durch Vorbehandlung mit nicht-ionisierenden Hochfrequenzfeldern (radiofrequencyfields) in Zellen ein gesteigertes Überleben nach Röntgenstrahlung zu induzieren (Sannino, et al., 2014). Auch eine Vorbehandlung mit Cadmiumchlorid vor Röntgenstrahlung kann ein gesteigertes Überleben hervorbringen (Pan, et al.). Weitere Studien belegen, dass eine Adaptive Antwort durch Kombination von ionisierender Strahlung (Alphastrahlung) und Chemikalien (Cadmiumchlorid) nachgewiesen werden kann (Choi, et al., 2013).

Insgesamt bestätigt sich die Beobachtung, dass eine Adaptive Antwort als uniforme Zellantwort unabhängig von der schädigenden Noxe ausgelöst werden kann.

#### **4.4 Einfluss der Vorbestrahlung durch Röntgen auf den Uptake von $^{99\text{m}}\text{Tc}$**

Die Höhe des Radionuklid-Uptakes bestimmt die Dosis und damit den folgenden Zellschaden. Aus der Literatur ist der sogenannte Stunning Effekt (Park, et al., 1994) bekannt, nachdem eine diagnostische Vorbehandlung mit  $^{131}\text{I}$  nach ca. 24 h zu einer verminderten Radionuklidaufnahme bei der therapeutischen Folgebestrahlung führt. Es konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob der geringere Uptake durch eine verminderte Expression von NIS-Rezeptoren (Norden, et al., 2007) oder durch die nach der ersten Bestrahlung reduzierte Zellzahl im Gewebe (Sisson, et al., 2006) bedingt wird. Die Adaptive Antwort konnte in dieser

Arbeit in Zeiträumen von 6 h bis 8 h nach der Erstbestrahlung nachgewiesen werden. Es sollte ausgeschlossen werden, dass dieser protektive Effekt auf einer deutlichen Uptake-reduktion beruht. In den durchgeführten Versuchen zeigten sich 4 h und 6 h nach der Vorbestrahlung keine signifikanten Unterschiede der Radioaktivitätsaufnahme im Vergleich zu unvorbestrahlten Zellen. Somit konnte kein Zusammenhang zwischen der Ausbildung einer Adaptiven Antwort und einer Uptake-Änderung hergestellt werden.

#### **4.5 Die Adaptive Antwort als Reaktion auf Zellstress**

Alle lebenden Organismen verfügen über ein komplexes Verteidigungssystem gegenüber verschiedenen Stressfaktoren. Das übergeordnete Ziel ist es dabei stets, die Krise zu überleben (Ikushima, 1999). Es ist beobachtet worden, dass unterschiedliche Arten von Stress (Hypoxie, oxidativer Stress, Hitze, ionisierende Strahlung, Kalorienrestriktion, Gift, psychologischer Stress, Training) in Zellen eine nicht-lineare Reaktion hervorrufen, sodass Zellen auf den gleichen Stressor bei einer niedrigen Dosis anders reagieren als bei einer hohen Dosis. Dementsprechend kann eine Präkonditionierung mit einer niedrigen Dosis die Folgeschäden bei einer anschließenden hohen Dosis verringern, genau wie es bei der Adaptiven Antwort der Fall ist (Calabrese, et al., 2007). Dieser Effekt ist in verschiedenen Fachdisziplinen beobachtet worden, wodurch für ähnliche Effekte eine Vielzahl an unterschiedlichen Bezeichnungen im Umlauf sind (Adaptive Antwort, Autoprotektion (autoprotection), Heteroprotektion (heteroprotection), Präkonditionierung, Hormesis, Xenohormesis). Calabrese et al. schlug daher eine gemeinsame Klassifizierung vor, bei der die Adaptive Antwort unter dem Begriff „Radiation conditioning hormesis“ geführt werden sollte (Calabrese, et al., 2007). Die Adaptive Antwort lässt sich in diesem Sinne als eine Überlebensstrategie unter vielen einordnen.

Betrachtet man die Mechanismen der Adaptiven Antwort genauer, wird klar, dass die Abwehr von oxidativem Stress essentiell für deren Ausbildung ist (siehe 4.7. Mechanismen der Adaptiven Antwort). Zellen mit einem aeroben Stoffwechsel sind abhängig vom Sauerstoff und müssen gleichzeitig Strategien besitzen, um mit dem unvermeidbaren oxidativem Stress umzugehen. Eine Stoffwechsellage mit einer erhöhten Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) entsteht sowohl physiologisch als auch durch Strahlung. Das Überleben einer Spezies hängt unter anderem davon ab, wie gut sie sich an diese angepasst hat. Daher existieren viele Bewältigungsstrategien von Zellen gegen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), zu denen man auch die Adaptive Antwort zählen kann (Yu and Chung, 2006).

Die Adaptive Antwort als eigenständiger Effekt ist meist nur in einem begrenztem Dosisbereich und Zeitfenster nachweisbar. Da eine entsprechende Sequenz von Ereignissen unter normalen Lebensbedingungen selten auftritt, könnte man sich fragen, wozu die Evolution ein so komplexes System wie die Adaptive Antwort hervorgebracht hat. Die Adaptive Antwort

stellt jedoch nur einen Teil des Verteidigungssystems der Zelle gegenüber verschiedenen Arten von Stressoren dar, deren komplexe Mechanismen ineinander greifen und einander ergänzen.

#### **4.6 Einordnung der Adaptiven Antwort zu anderen Niedrig-Dosis-Effekten**

In der Strahlenbiologie sind Niedrig-Dosis-Effekte untersucht worden. Diese werden zumeist durch indirekte Strahlenschäden verursacht (Waldren, 2004). Zu ihnen zählt neben der Adaptiven Antwort die Hormesis, der Bystander Effekt und die HRS bzw. die induzierte Radioresistenz. Die Abgrenzung dieser biologischen Effekte voneinander ist schwierig, vor allem da die Begriffe in der Literatur nicht immer einheitlich verwendet werden.

Als Hormesis wird im Allgemeinen bezeichnet, wenn ein Agens, das in einer hohen Dosis schädlich für die Zelle bzw. den Organismus ist, in einer geringen Dosis einen vorteilhaften Effekt erzielt (Cai, 1999). Da auch bei der Adaptiven Antwort eine geringe Dosis etwas Positives, nämlich einen protektiven Effekt auf eine folgende hohe Dosis, bewirkt, könnte man sie in diesem Sinne als spezifische Form der Hormesis unterordnen. Andere Autoren grenzen die Hormesis und die Adaptive Antwort als gleichberechtigte Effekte voneinander ab, da bei der Adaptiven Antwort der positive Effekt erst nach dem zweitem Stressereignis ersichtlich ist, während die Hormesis schon nach einmaliger Applikation von Strahlung Schutzeffekte hat. Gemeinsam ist beiden Effekten jedoch, dass sie jeweils von geringen Dosen ausgelöst werden (Rigaud, 1999). Deswegen vermutet man als Hintergrund ähnliche Zellmechanismen (Mossman and Ledesma, 1999).

Wenn unbehandelte Zellen eine biologische Antwort zeigen, weil sie entweder Signale von bestrahlten Zellen erhalten oder in einem Medium von bestrahlten Zellen kultiviert werden, wird dies als Bystander Effekt bezeichnet (Kadhim, et al., 2004). Als Ursachen wurden sowohl interzelluläre Kommunikationsmechanismen (gap junctional intercellular communication (GJIC)) als auch eine Kommunikation über lösliche Transmitter im Medium beschrieben. Der Bystander Effekt stellt einen weiteren Niedrig-Dosis-Effekt dar, der viele Gemeinsamkeiten mit der Adaptiven Antwort hat. So werden beide in Niedrig-Dosis-Bereichen nachgewiesen und zeigen eine nicht-lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung (Kadhim, et al., 2004). Einen weiteren Zusammenhang konnten Matsumoto et al. zeigen, in dem auch Zellen, die nicht direkt bestrahlt wurden, eine Adaptive Antwort als Bystander Effekt ausbilden konnten (Matsumoto, et al., 2004). Auch die genomische Instabilität konnte von Morgan et al. als Bystander Effekt in vivo nachgewiesen werden (Morgan, 2003).

Ein weiterer Niedrig-Dosis-Effekt ist die HRS, eine relative Überempfindlichkeit nach Niedrig-Dosis-Behandlung. Damit wird die Beobachtung bezeichnet, dass Zellen bis zu einer bestimmten Grenze hypersensibel auf Strahlung reagieren. Eine Begründung hierfür könnte



sein, dass einige Zellreparatursysteme erst ab einer bestimmten Schwellendosis aktiviert werden. Da sich die Adaptive Antwort und die HRS in vergleichbaren Dosisbereichen ausbilden (zumindest was die Vorbestrahlung betrifft), wird vermutet, dass auch hier ähnliche Mechanismen eine Rolle spielen (Joiner, et al., 1996; Joiner, et al., 1999).

#### **4.7 Mechanismen der Adaptiven Antwort**

In den letzten Jahren konzentrierte sich die Forschung um die Adaptive Antwort vor allem auf die zugrunde liegenden Mechanismen. Die niedrig dosierte Vorbestrahlung induziert über verschiedene Zellsignalwege eine schnellere DNA-Reparatur, eine verbesserte Abwehr von oxidativem Stress, eine vermehrte Bildung anti-apoptotischer Proteine und eine Veränderung des Zellzyklus (Miura, 2004). Deshalb kommt es bei der folgenden Bestrahlung mit einer wesentlich höheren Dosis zu einem verminderten Zellschaden.

Aktiviert werden diese Zellsignalwege direkt über die durch die Ionisierende Strahlung verursachte direkte DNA-Schädigung, oder durch indirekte Schädigung über Reaktive Sauerstoffspezies (Ahmed and Li, 2008).

In Folge der Bestrahlung wird beispielsweise über den Gentranskriptionsfaktor NFκB vermehrt Superoxiddismutase (MnSOD) exprimiert, wodurch eine schnellere Reduktion von Sauerstoffradikalen ermöglicht wird (Fan, et al., 2007; Murley, et al., 2011). Auch Glutathionperoxidase und Katalase, zwei weitere Schlüsselenzyme der oxidativen Stressantwort, waren in vorbestrahlten Zellen höher konzentriert als in unvorbehandelten Zellen (Bravard, et al., 1999). Weitere Einzelheiten dieser Signalwege werden aktuell noch untersucht, so konnte Grdina et al. zeigen, dass ein intakter TNF-alpha-Signalweg Voraussetzung für eine erhöhte Superoxiddismutase-Aktivität ist (Grdina, et al., 2013). Das Protein p53 spielt über die Bildung von NO-Radikalen ebenfalls eine Rolle in der Abwehr von oxidativem Stress (Matsumoto, et al., 2007b; Takahashi, et al., 2008; Takahashi and Ohnishi, 2009). Da in vielen Tumorzellen das p53-Gen mutiert ist, könnte dies ein Grund für eine reduzierte Ausprägung der Adaptiven Antwort bei Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen sein.

Ebenfalls über NFκB kommt es zu einer Beeinflussung der Cyclin-Proteine sowie der dazugehörigen Cyclin-abhängigen Kinasen (Fan, et al., 2007; Ahmed and Li, 2008), die entscheidend für den Eintritt der Zelle in die Mitose sind. Der Zellzyklus wird so am Übergang zwischen G2-Phase und Mitose arretiert. So kann die nach der Folgebestrahlung notwendige DNA-Reparatur ungestört effizienter, schneller und mit einer niedrigeren Fehlerrate durchgeführt werden (Takahashi, et al., 2001; Zhou and Rigaud, 2001; Alexandrou and Li, 2014).

Verlieren Zellen ihre Fähigkeit zur Behebung von DNA-Schäden, zum Beispiel zur Nukleotidexzisionsreparatur, kann keine Adaptive Antwort mehr erzeugt werden (Hafer, et

al., 2007). Bereits Kleczkowska und Althaus konnten nachweisen, dass ohne DNA-Reparaturenzyme wie die Poly(ADP-ribose)-Polymerase oder die DNA Topoisomerase keine Adaptive Antwort auslösbar ist (Kleczkowska and Althaus, 1996). Die Aktivierung dieser Reparaturenzyme erfolgt unter anderem über Regulationsenzyme wie die Proteinkinase C oder die MAP-Kinase (Ibuki and Goto, 1994; Shimizu, et al., 1999; Miura, 2004).

Ein Beispiel für anti-apoptotische wirkende Proteine sind die Hitzeschockproteine, die nach einer Vorbestrahlung vermehrt gebildet werden und so an der Entstehung einer Adaptiven Antwort beteiligt sind (Lee, et al., 2002).

Insgesamt entsprechen die aufgeführten Mechanismen einer breiten Stressantwort der Zelle, die nicht nur durch ionisierende Strahlung, sondern auch durch andere schädigende Noxen ausgelöst werden kann. Es wird noch untersucht, ob verschiedene Zellmechanismen zu einer frühen oder späten Adaptiven Antwort führen können und warum auf der einen Seite eine Radioresistenz ausgebildet werden kann und auf der anderen Seite nur ein zeitlich limitierter Schutz entsteht. Gegenstand weiterer Forschung wird sein, wie die komplexen Mechanismen der Zellantwort auf ionisierende Strahlung ineinandergreifen (Jeggo and Lobrich, 2006).

#### **4.8 Bedeutung der Adaptiven Antwort**

Die Adaptive Antwort gehört in der Strahlenbiologie zu den Niedrig-Dosis-Effekten und stellt einen Teil der Überlebensstrategien von Zellen auf Umweltstressoren dar. Welche physiologische Bedeutung die Adaptive Antwort im menschlichen Organismus hat, ist auch heute noch Gegenstand von Untersuchungen.

Der Mensch ist ständig einer natürlichen ionisierenden Strahlung, sowohl kosmischer als auch terrestrischer Natur, ausgesetzt. Dazu kommen künstliche von Menschen verursachte Strahlenbelastungen, zum Beispiel durch Atomunfälle oder Atombomben, aber vor allem durch medizinische Behandlungen. Es gibt, je nach Wohnort, eine große Variation der jährlichen individuellen Strahlenbelastung. Man konnte nachweisen, dass sich für die Bevölkerung von Regionen mit hohen natürlichen Strahlenbelastungen (high natural radiation background areas) keine schädlichen biologischen Effekte ergeben (Wei, et al., 1990). Daraus kann man folgern, dass ein gewisses Maß an Strahlung nicht schädlich für den Menschen ist und unser Organismus eine gewisse Toleranz gegenüber Strahlung besitzt (Cai, 1999). In manchen Studien konnten für diese Bevölkerung sogar Vorteile, zum Beispiel im Sinne einer erniedrigten Krebsrate bewiesen werden (Jagger, 1998; Luckey, 1999). Auch für Überlebende eines Atombombenanschlags wurde eine niedrigere Krebsinzidenz nachgewiesen (Mossman, 1998). In Tierstudien wurde diese Beobachtung bereits experimentell bestätigt (Ishii, et al., 1996).

All diese Beobachtungen und die Forschungen im Niedrig-Dosis-Bereich zeigen, dass Organismen und Zellen auf Strahlenbelastungen nicht linear reagieren. Dies widerspricht dem Prinzip des Linear-No-Threshold-Modells (LNT-Modell), in dem man von einer linearen Dosis-Wirkungs-Beziehung ausging (Mossman, 1998). Dieses Modell wurde verwendet, um Strahlenschutz-Verordnungen zu erstellen, indem die Folgen von hohen Strahlenbelastungen auf den Niedrig-Dosis-Bereich extrapoliert wurden (Rigaud, 1999). Das LNT-Modell überschätzt so die Wirkung von ionisierender Strahlung bei niedrigen Dosen (Ikushima, 1999). Da es an einer geeigneten Alternative fehlt, wird es jedoch weiterhin verwendet.

#### **4.9 Die Adaptive Antwort in der Medizin**

Es gibt in der Literatur verschiedene Ansätze in denen untersucht wird, wie man sich den Effekt der Adaptiven Antwort in der Medizin zu nutzen machen könnte bzw. inwiefern sie einen Einfluss auf Therapieergebnisse hat.

In der Onkologie wäre es beispielsweise ein großer Vorteil, wenn die an einen Tumor grenzenden gesunden Zellen mit einer niedrig dosierten Vorbestrahlung durch die folgende Adaptive Antwort bei einer höher dosierten Chemo- oder Radiotherapie geschützt werden könnten. Dazu müsste man in der Lage sein, die Adaptive Antwort auf Normalgewebe zu begrenzen (Cai, 1999; Mossman and Ledesma, 1999). Aktuell gibt es noch widersprüchliche Aussagen darüber, ob Tumor- und Normalzellen gleichsam eine Adaptive Antwort ausbilden (Boothman, et al., 1996). Vor einer Tumorthherapie erhalten Patienten meist niedrige Strahlendosen zur Diagnostik, dies könnte so einen Einfluss auf die Effektivität der folgenden Strahlen- bzw. Chemotherapie haben (Ikushima, 1999; Monteiro Gil, et al., 2002). Inwiefern sich die Adaptive Antwort in der Strahlentherapie nutzen lässt, ist noch nicht geklärt. In einigen Studien zeigte sich zudem eine große interindividuelle Variabilität (Bauchinger, et al., 1989; Mortazavi, et al., 2003) bei der Ausprägung der Adaptiven Antwort, sodass sie in der Praxis nur schwer einzuplanen wäre.

Auch aus anderen medizinischen Fachdisziplinen ist bekannt, dass eine niedrigdosierte Präkonditionierung einen protektiven Effekt auf eine folgende Schädigung haben kann. So wurde in der Kardiologie bewiesen, dass eine ischämische Präkonditionierung bei einem folgendem Myokardinfarkt zu einem geringeren Schaden führt, da weniger oxidativer Stress entsteht (Hawaleshka and Jacobsohn, 1998). Mittlerweile konnte sogar ein positiver Effekt durch Postkonditionierung nachgewiesen werden. So führt ein niedriges Level an erneutem hypoxischen Stress, das nach einem Myokardinfarkt induziert wird, zu einem besseren Outcome (Zhao, et al., 2003).

Aus einer weiteren Erforschung der Mechanismen der Adaptiven Antwort und der anderen Niedrig-Dosis-Effekte könnten sich neue Erkenntnisse über die Pathomechanismen ver-

schiedener Krankheiten (Xeroderma pigmentosum, Bloom-Syndrom, Fanconi Anämie, Ataxia teleangiectasia) ergeben (Mossman and Ledesma, 1999).

In der modernen Tumorbehandlung werden Vor- und Nachteile einer Kombination von interner und externer Radiotherapie (CIERT) erforscht (Kotzerke and Oehme, 2010; Dietrich, et al., 2015). Dazu sind Erkenntnisse über die Niedrig-Dosis-Effekte und mögliche Auswirkungen auf das Therapieergebnis essentiell. Auch der Einfluss der Adaptiven Antwort auf die Radionuklidtherapie ist noch nicht ausreichend untersucht worden (Murray and McEwan, 2007; Kumar, et al., 2016). Insgesamt scheint der Einfluss der Niedrig-Dosis-Effekte, wie der Adaptiven Antwort, auf das Behandlungsergebnis jedoch eher vernachlässigbar. Die zur Auslösung einer Adaptiven Antwort führenden Vor- und Nachbestrahlungsdosen, sowie das begrenzte Zeitfenster finden in der Praxis keine Entsprechung. So wären die bei einer Röntgenaufnahme oder einer Szintigraphie wirkenden Dosen zu gering bzw. bei der fraktionierten Strahlentherapie zu hoch um die Ausbildung einer Protektion zu bewirken.

Ein weiterer Ansatz geht von dem Gedanken aus, dass die Adaptive Antwort vor oxidativem Stress schützt. In diesem Sinne könnte man sie als Schutz vor Krankheiten wie der Alzheimer-Demenz, zu deren Pathomechanismen der oxidative Stress zählt, nutzen (Cai, 1999).

Ob und in welchem Ausmaß eine Adaptive Antwort gebildet wird, könnte für bestimmte Berufsgruppen wie Arbeiter in Atomkraftwerken oder fliegendes Personal, die zum Teil hohen Strahlenbelastungen ausgesetzt sind, entscheidend sein (Ikushima, 1999; Mortazavi, et al., 2003). Im Allgemeinen erscheint es sehr wichtig die Auswirkungen der Niedrig-Dosis-Effekte auf den Menschen zu erforschen, um sie in Hinblick auf Krebsrisiken bzw. den Strahlenschutz besser einordnen zu können (Matsumoto, et al., 2004).

Im alltäglichen Leben eines Menschen folgt auf eine niedrige Vorbelastung (Vorbestrahlung/Präkonditionierung) nur selten eine hohe Stressbelastung (Nachbestrahlung). Das wirft die Frage auf, welchen biologischen Zweck die durch die Präkonditionierung aktivierten Mechanismen haben (Mossman and Ledesma, 1999). Die beteiligten Mechanismen könnten das Potential repräsentieren, die ständigen Schädigungen durch endogene Prozesse zu vermindern und somit einen Mechanismus darstellen, der die normale „Erkrankungsrate“ reduziert (Calabrese, 2016).

#### **4.10 Ausblick**

Als Ergänzung zu dieser Arbeit könnten weitere experimentelle Untersuchungen in viele verschiedene Richtungen erfolgen. Der Nachweis der Adaptiven Antwort könnte mit weiteren, verschiedenen offenen Radionukliden versucht werden, gegebenenfalls sollte jeweils eine Variation der Sequenzen verschiedener Strahlenqualitäten erfolgen. Der Einsatz anderer

Nachweismethoden, beispielsweise des  $\gamma$ -H2AX-Immunfluoreszenz-Assays, würde dazu dienen, die Rolle von DSB und die Induktion von Reparaturmechanismen der Adaptiven Antwort näher zu betrachten. Der Nachweis von Schlüsselproteinen wie NF $\kappa$ B und der Superoxiddismutase (MnSOD) mittels Western Blot könnte die beteiligten Zellsignalwege näher beleuchten. Eine detailliertere Untersuchung der Abhängigkeit der Höhe der Adaptiven Antwort von der Vorbestrahlungsdosis würde sich anbieten.

Die Beziehung der Adaptiven Antwort zu anderen Niedrig-Dosis-Effekten wie dem Bystander-Effekt wäre ein weiterer interessanter Ansatz. So könnte untersucht werden, ob in unbestrahlten Zellen ein Adaptiver Effekt induzierbar ist, wenn man das Medium vorbestrahlter Zellen auf sie überträgt.

Um einen möglichen Nutzen der Adaptiven Antwort in der Strahlentherapie zu erforschen, müssten vergleichende Untersuchungen zwischen Tumor- und Normalzellen erfolgen. Ein weiterer Schritt wären in vivo Versuche, wobei vor allem die interindividuellen Unterschiede und deren Ursachen interessant wären.

#### **4.11 Limitationen**

Bei der Durchführung der Untersuchung ergaben sich durch das experimentelle Design einige Einschränkungen.

Die verwendeten FRTL-5 Zellen wurden nach dem Auftauen für maximal 10 Zellpassagen verwendet. Aus praktischen Gründen konnte nicht immer gewährleistet werden, dass für alle Untersuchungen die gleiche Zellpassage zum Einsatz kam. Dies beeinflusst zahlreiche Faktoren wie das Wachstumsverhalten und die funktionelle Integrität der Zellen und könnte sich somit auf die Ergebnisse ausgewirkt haben.

In den Experimenten wurden die Zellen in Monolayer-Kulturen untersucht. Durch das Fehlen der natürlichen dreidimensionalen Gewebestruktur, wie sie zum Beispiel durch Sphäroide in vitro untersucht werden könnte, werden Faktoren wie die Zell-Zell-Kommunikation oder die Extrazelluläre Matrix in den Ergebnissen vernachlässigt. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf in vivo Bedingungen kann daher nicht vorausgesetzt werden.

Ein weiteres limitierendes Kriterium ergibt sich aus den Bestrahlungsbedingungen. Während die Bestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  über eine Stunde erfolgte, war die Bestrahlungszeit bei Röntgenstrahlung von der applizierten Dosis abhängig und fiel insgesamt wesentlich kürzer aus (von 4 s bis 8 min 7 s). Außerdem erfolgte die Röntgen-Bestrahlung aus organisatorischen Gründen in einem anderen Gebäude, sodass der Zelltransport einen weiteren Einfluss auf das Zellüberleben gehabt haben könnte. Soweit möglich wurden die Bestrahlungen, abgesehen

von diesen Einschränkungen, unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Insbesondere waren die jeweiligen Kontrollzellen immer den gleichen äußeren Bedingungen ausgesetzt.

Für die Auswertung des Koloniebildungstests erfolgte die manuelle Auszählung der Kolonien mithilfe eines Lichtmikroskops. Vor allem bei höheren Strahlendosen wurde die Unterscheidung zwischen Zellhaufen und Kolonien zunehmend schwierig, sodass individuelle Fehler bei der Auszählung nicht auszuschließen sind.

Um die Bestrahlungsmodalitäten vergleichen zu können, wurden mit Hilfe des MIR-D-Kugelmodells aus der Aktivitätskonzentration und der Bestrahlungsdauer von  $^{99m}\text{Tc}$  (+/- Perchlorat) eine intrazelluläre Dosis berechnet (Bolch, et al., 2009; Freudenberg, et al., 2014). Dieses Modell ist abhängig von zahlreichen Einflussfaktoren wie zum Beispiel der Zellzahl, dem Uptake, der Zellgröße und der Aktivitätsverteilung. Schwankungen der Einflussfaktoren führen zu erheblichen Abweichungen der tatsächlichen von der berechneten Dosis. Wie im Abschnitt 4.1.3 (Vergleich der Strahlenqualitäten) bereits erläutert, war die Erstellung der  $D_{37}$  bei Bestrahlung von  $^{99m}\text{Tc}$  mit Perchlorat nicht möglich. Ein direkter Beweis für vergleichbare Dosis-Wirkungs-Beziehungen aller Strahlenqualitäten konnte somit nicht erbracht werden.

Für den Nachweis der Adaptiven Antwort wurde der Koloniebildungstest erfolgreich eingesetzt. Durch den Einsatz weiterer, ergänzender Nachweismethoden hätten die Mechanismen und die Art der Zellschädigung (DSB, ESB) näher betrachtet werden können.

## 5 Zusammenfassung

Der Umgang mit ionisierender Strahlung in der medizinischen Diagnostik und Therapie gewinnt ständig an Bedeutung. Welche Auswirkungen dabei geringe Dosen ionisierender Strahlung auf biologische Systeme haben, ist daher relevant und Gegenstand der Forschung. Die Adaptive Antwort kann in der Strahlenbiologie den Niedrig-Dosis-Effekten zugeordnet werden. Dieser Effekt, der auch als Präkonditionierung bezeichnet wird, beschreibt den protektiven Effekt, den eine niedrig dosierte Vorbestrahlung auf eine hoch dosierte Folgebestrahlung hat. Die Adaptive Antwort lässt sich beispielsweise durch Reduzierung von DNA-Schäden oder ein verbessertes Zellüberleben nachweisen. Die protektive Wirkung vor einer hohen Dosis tritt nur in einem begrenzten Zeitfenster zur Vorbestrahlung auf.

In dieser Arbeit erfolgte der Nachweis der Adaptiven Antwort an Rattenschilddrüsenzellen, die über einen Natriumiodidsymporter (NIS) verfügen. Nach einer niedrig dosierten Vorbestrahlung und einem bestimmten Erholungsintervall erfolgte dazu jeweils eine zweite Bestrahlung mit einer therapeutisch wirksamen Dosis. Als biologischer Endpunkt wurde das klonogene Zellüberleben (Koloniebildungstest) gewählt. Die Bestrahlung erfolgte mit Röntgenstrahlung und  $^{99m}\text{Tc}$ . Das  $^{99m}\text{Tc}$  wird über den NIS in die Zellen aufgenommen. Diese intrazelluläre Radionuklidaufnahme kann durch Zugabe von Perchlorat fast vollständig blockiert werden. So konnte mit  $^{99m}\text{Tc}$  sowohl ein intrazellulärer als auch ein extrazellulärer Bestrahlungsmodus realisiert werden. Durch die Untersuchung des Uptakes wurde jeweils das Ausmaß der intrazellulären Radionuklidaufnahme bestimmt. Ziel dieser Arbeit war es, die Adaptive Antwort durch Kombination und Variation der Bestrahlungssequenzen Röntgenstrahlung,  $^{99m}\text{Tc}$  und  $^{99m}\text{Tc}$  mit Perchlorat nachzuweisen.

Zur Einschätzung der Radiotoxizität wurden Dosis-Wirkungs-Kurven der Bestrahlungsmodalitäten erstellt. Dabei konnten linear-quadratische bzw. lineare Dosis-Wirkungs-Beziehungen nachgewiesen werden. Die intrazelluläre Aufnahme von  $^{99m}\text{Tc}$  führte im Vergleich zur extrazellulären Bestrahlung durch Inkubation mit Perchlorat bei gleichen Aktivitätskonzentrationen zu stark verminderten Überlebensfraktionen. Die Ergebnisse wurden verwendet, um geeignete Dosisbereiche zum Nachweis der Adaptiven Antwort zu ermitteln.

Die Adaptive Antwort wurde zunächst durch zweimalige Bestrahlung durch die gleiche Strahlenqualität nachgewiesen. Für Röntgenstrahlung,  $^{99m}\text{Tc}$  und  $^{99m}\text{Tc}$  mit Perchlorat wurden jeweils die Vorbestrahlungsdosen von 0,01 Gy bis 0,75 Gy und die Erholungszeiten von 2 h bis 24 h untersucht. Nachbestrahlt wurde bei Röntgenstrahlung und  $^{99m}\text{Tc}$  mit 2 Gy und bei  $^{99m}\text{Tc}$  mit Perchloratinkubation mit 1 Gy. Der Nachweis eines höheren Zellüberlebens durch die Vorbestrahlung gelang bei allen drei Bestrahlungsmodalitäten. Die Adaptive Antwort war

jeweils bei 0,025 Gy und 0,05 Gy Vorbestrahlungsdosis und nach 6 h Erholungszeit am stärksten ausgeprägt. Nach 10 h war jeweils keine protektive Wirkung nach Vorbestrahlung mehr nachweisbar.

Im Folgenden wurden die Bestrahlungsmodalitäten untereinander variiert. So wurde Röntgenstrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$ , sowie Röntgenstrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  und Perchlorat kombiniert und die Sequenzen jeweils variiert. Als Vorbestrahlungsdosen wurden 0,025 Gy und 0,05 Gy gewählt. Die Zeitfenster zwischen Vor- und Nachbestrahlung betragen 4 h; 6 h und 24 h. Bei allen 4 Kombinationen konnte nach 6 h Erholungszeit eine Adaptive Antwort nachgewiesen werden. Die größte protektive Wirkung konnte in allen Versuchen durch 0,05 Gy Vorbestrahlung erreicht werden.

Entsprechend der Zielsetzung konnte in dieser Arbeit die Adaptive Antwort unabhängig von der Bestrahlungsmodalität und deren Sequenz bei Vor- und Nachbestrahlung nachgewiesen werden. Insbesondere gelangen der Vergleich und die Kombination aus extra- und intrazellulärer Bestrahlung. Es konnte bestätigt werden, dass der durch die Vorbehandlung induzierte protektive Effekt nur in einem begrenzten Zeitfenster bestehen bleibt. Des Weiteren zeichnete sich eine Abhängigkeit des Ausmaßes der Adaptiven Antwort von der Vorbestrahlungsdosis ab. Die Ergebnisse bestätigen die aktuell anerkannte Hypothese, die die Adaptive Antwort als Teil einer allgemeinen Stressantwort der Zelle auf verschiedene Noxen sieht (Calabrese, et al., 2007). Im Hinblick auf moderne Therapieansätze in der Onkologie, wie CIERT oder der Radiorezeptorthherapie, ist der Einfluss der Niedrig-Dosis-Effekte, wie der Adaptiven Antwort, auf das Behandlungsergebnis jedoch eher vernachlässigbar. Die angewandte Induktionsdosis sowohl durch eine Röntgenuntersuchung als auch durch eine Szintigraphie ist zu gering bzw. bei der fraktionierten Strahlentherapie zu hoch, um eine Adaptive Antwort zu induzieren. Weiterhin ist das Zeitfenster für die Ausbildung der Protektion in der Praxis nicht gegeben.



## 6 Summary

The utilization of ionizing radiation is gaining in importance in medical diagnosis and treatment. The consequences of low-dose radiation to biological systems are therefore relevant and a matter of ongoing research. In radiobiological research the adaptive response is part of the low-dose effects. The adaptive response, which is also termed as preconditioning, describes the effect, when a low dose of ionizing radiation results in an enhanced resistance to a subsequent high dose of radiation. The adaptive response can be measured for instance as a reduction of DNA-damage or an increased cell survival. The protective effect is limited to an interval.

In this study the adaptive response was investigated by using a rat thyroid cell line expressing the sodium iodide symporter (NIS). Following a low-dose radiation (adaptive dose) and a certain time interval, the cells were irradiated with a higher dose (challenge dose). To detect the cellular survival the colony formation assay was used as biological endpoint. Extern X-Ray-radiation and the radionuclide  $^{99m}\text{Tc}$  were used for radiation.  $^{99m}\text{Tc}$  can be accumulated by the cells via the NIS. The radionuclide uptake can be almost completely blocked by incubation with sodium perchlorate, enabling an intra- and extracellular irradiation using  $^{99m}\text{Tc}$ . The aim of the study was to show an adaptive response by varying the combination of the different radiation qualities and their sequences.

To evaluate the radiotoxicity the cellular survival was analyzed for X-Ray,  $^{99m}\text{Tc}$  and  $^{99m}\text{Tc}$  with perchlorate irradiation without any preconditioning setup. The dose-response curves were evaluated for each of the radiation qualities. The intracellular uptake of  $^{99m}\text{Tc}$  resulted in a much reduced cell survival compared to the extracellular irradiation by pre-incubating with perchlorate. The uptake results were used to calculate the appropriate dose ranges for the experiments.

Firstly, the adaptive response was studied by adaptive and challenging doses using the same radiation qualities. The doses for the preconditioning dose (X-Ray,  $^{99m}\text{Tc}$  and  $^{99m}\text{Tc}$  with perchlorate) was varied from 0,01 Gy to 0,75 Gy; the time interval until the second irradiation was 2 h to 24 h. The challenging doses were 2 Gy for X-Ray and  $^{99m}\text{Tc}$  and 1 Gy for  $^{99m}\text{Tc}$  with perchlorate. The highest adaptive responses could be shown with 0,025 Gy and 0,05 Gy pre-irradiation and with an interval of 6 h holding true for each of the radiation qualities. The protective effect of the pre-irradiation could be not observed with an interval of 10 h between the applied doses. Altogether, the enhanced cell survival of the pre-irradiated samples was shown for each of the 3 radiation qualities.

In the second setup the different radiation qualities were varied and the adaptive effect was analyzed. X-Ray and  $^{99m}\text{Tc}$  as well as X-Ray and  $^{99m}\text{Tc}$  with perchlorate were combined and their sequences were varied. For pre-irradiation doses of 0,025 Gy and 0,05 Gy were chosen. The tested intervals were 4 h; 6 h and 24 h. All 4 combinations showed an adaptive response using a 6 h interval between the irradiations. The highest adaptive effect could be obtained with at the dose point 0,05 Gy of pre-irradiation for all radiation qualities.

According to the aim of this study we were successful in showing an adaptive response independently of the radiation quality as well as their sequences used for pre-irradiation and the challenging doses. In particular, we were able to indicate an adaptive response using different radiators for priming and challenging doses. It could be demonstrated, that the protective effect induced by the low-dose pre-irradiation is limited to a special time frame. Further, a correlation between the pre-irradiation dose and the extent of the adaptive response is suggested. The results confirm the hypothesis, that the adaptive response is a part of the general stress-response of the cell against many kinds of damaging noxes (Calabrese, et al., 2007).

The impact of low-dose effects such as the adaptive response regarding modern therapeutic approaches in oncology like CIERT or radionuclide therapy seems to be negligible. Due to very low doses used in diagnostics with X-ray or scintigraphy and higher doses in radiation therapies an adaptive effect could not be expected.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahmed KM, Li JJ. 2008. NF- $\kappa$ B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation. *Free Radic Biol Med* 44.
- Alexandrou AT, Li JJ. 2014. Cell cycle regulators guide mitochondrial activity in radiation-induced adaptive response. *Antioxid Redox Signal* 20(9):1463-80.
- Assis ML, De Mattos JC, Caceres MR, Dantas FJ, Asad LM, Asad NR, Bezerra RJ, Caldeira-de-Araujo A, Bernardo-Filho M. 2002. Adaptive response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> protects against SnCl<sub>2</sub> damage: the OxyR system involvement. *Biochimie* 84(4):291-4.
- Audette-Stuart M, Kim SB, McMullin D, Festarini A, Yankovich TL, Carr J, Mulpuru S. 2011. Adaptive response in frogs chronically exposed to low doses of ionizing radiation in the environment. *J Environ Radioact* 102(6):566-73.
- Bauchinger M, Schmid E, Braselmann H, Nahrstedt U. 1989. Absence of adaptive response to low-level irradiation from tritiated thymidine and X-rays in lymphocytes of two individuals examined in serial experiments. *Mutat Res* 227(2):103-7.
- Bodgi L, Canet A, Pujol-Menjouet L, Lesne A, Victor JM, Foray N. 2016. Mathematical models of radiation action on living cells: From the target theory to the modern approaches. A historical and critical review. *J Theor Biol* 394:93-101.
- Bolch WE, Eckerman KF, Sgouros G, Thomas SR. 2009. MIRD pamphlet No. 21: a generalized schema for radiopharmaceutical dosimetry--standardization of nomenclature. *J Nucl Med* 50(3):477-84.
- Boothman DA, Meyers M, Odegaard E, Wang M. 1996. Altered G1 checkpoint control determines adaptive survival responses to ionizing radiation. *Mutat Res* 358(2):143-53.
- Bravard A, Luccioni C, Moustacchi E, Rigaud O. 1999. Contribution of antioxidant enzymes to the adaptive response to ionizing radiation of human lymphoblasts. *Int J Radiat Biol* 75(5):639-45.
- Broome EJ, Brown DL, Mitchel RE. 2002. Dose responses for adaption to low doses of <sup>60</sup>Co gamma rays and <sup>3</sup>H beta particles in normal human fibroblasts. *Radiat Res* 158(2):181-6.

- Cai L. 1999. Research of the adaptive response induced by low-dose radiation: where have we been and where should we go? *Hum Exp Toxicol* 18(7):419-25.
- Cai L, Liu SZ. 1990. Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cells in vivo and in vitro by low-dose X-irradiation. *Int J Radiat Biol* 58(1):187-94.
- Calabrese EJ. 2016. Preconditioning is hormesis part II: How the conditioning dose mediates protection: Dose optimization within temporal and mechanistic frameworks. *Pharmacol Res* 110:265-75.
- Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L, Cedergreen N, Cherian MG, Chiueh CC, Clarkson TW and others. 2007. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol Appl Pharmacol* 222(1):122-8.
- Cao Y, Xu Q, Jin ZD, Zhou Z, Nie JH, Tong J. 2011. Induction of adaptive response: pre-exposure of mice to 900 MHz radiofrequency fields reduces hematopoietic damage caused by subsequent exposure to ionising radiation. *Int J Radiat Biol* 87(7):720-8.
- Carlin S, Mairs RJ, Welsh P, Zalutsky MR. 2002. Sodium-iodide symporter (NIS)-mediated accumulation of [(211)At]astatide in NIS-transfected human cancer cells. *Nucl Med Biol* 29(7):729-39.
- Chadwick KH, Leenhouts HP. 1973. A molecular theory of cell survival. *Phys Med Biol* 18(1):78-87.
- Choi VW, Konishi T, Oikawa M, Iso H, Cheng SH, Yu KN. 2010. Adaptive response in zebrafish embryos induced using microbeam protons as priming dose and X-ray photons as challenging dose. *J Radiat Res* 51(6):657-64.
- Choi VW, Ng CY, Kong MK, Cheng SH, Yu KN. 2013. Adaptive response to ionising radiation induced by cadmium in zebrafish embryos. *J Radiol Prot* 33(1):101-12.
- Dietrich A, Koi L, Zophel K, Sihver W, Kotzerke J, Baumann M, Krause M. 2015. Improving external beam radiotherapy by combination with internal irradiation. *Br J Radiol* 88(1051):20150042.
- Dohan O, Carrasco N. 2003. Advances in Na(+)/I(-) symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. *Mol Cell Endocrinol* 213(1):59-70.

- Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N. 2003. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev* 24(1):48-77.
- Elmore E, Lao XY, Kapadia R, Giedzinski E, Limoli C, Redpath JL. 2008. Low doses of very low-dose-rate low-LET radiation suppress radiation-induced neoplastic transformation in vitro and induce an adaptive response. *Radiat Res* 169(3):311-8.
- Fan M, Ahmed KM, Coleman MC, Spitz DR, Li JJ. 2007. Nuclear factor-kappaB and manganese superoxide dismutase mediate adaptive radioresistance in low-dose irradiated mouse skin epithelial cells. *Cancer Res* 67(7):3220-8.
- Franken NA, Oei AL, Kok HP, Rodermond HM, Sminia P, Crezee J, Stalpers LJ, Barendsen GW. 2013. Cell survival and radiosensitisation: modulation of the linear and quadratic parameters of the LQ model (Review). *Int J Oncol* 42(5):1501-15.
- Freudenberg R, Runge R, Maucksch U, Berger V, Kotzerke J. 2014. On the dose calculation at the cellular level and its implications for the RBE of (99m)Tc and (1)(2)(3)I. *Med Phys* 41(6):062503.
- Freudenberg R, Wendisch M, Runge R, Wunderlich G, Kotzerke J. 2012. Reduction in clonogenic survival of sodium-iodide symporter (NIS)-positive cells following intracellular uptake of 99mTc versus 188Re. *International Journal of Radiation Biology* 88(12):991-997.
- Gajendiran N, Tanaka K, Kumaravel TS, Kamada N. 2001. Neutron-induced adaptive response studied in go human lymphocytes using the comet assay. *J Radiat Res* 42(1):91-101.
- Grdina DJ, Murley JS, Miller RC, Mauceri HJ, Sutton HG, Li JJ, Woloschak GE, Weichselbaum RR. 2013. A survivin-associated adaptive response in radiation therapy. *Cancer Res* 73(14):4418-28.
- Hafer K, Iwamoto KS, Scuric Z, Schiestl RH. 2007. Adaptive response to gamma radiation in mammalian cells proficient and deficient in components of nucleotide excision repair. *Radiat Res* 168(2):168-74.
- Hawaleshka A, Jacobsohn E. 1998. Ischaemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications. *Can J Anaesth* 45(7):670-82.

- Howell RW. 1992. Radiation spectra for Auger-electron emitting radionuclides: report No. 2 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No. 6. *Med Phys* 19(6):1371-83.
- Ibuki Y, Goto R. 1994. Adaptive response to low doses of gamma-ray in Chinese hamster cells: determined by cell survival and DNA synthesis. *Biol Pharm Bull* 17(8):1111-3.
- Ikushima T. 1999. Radioadaptive response: responses to the five questions. *Hum Exp Toxicol* 18(7):433-5.
- Ikushima T, Aritomi H, Morisita J. 1996. Radioadaptive response: efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutat Res* 358(2):193-8.
- Ishii K, Hosoi Y, Yamada S, Ono T, Sakamoto K. 1996. Decreased incidence of thymic lymphoma in AKR mice as a result of chronic, fractionated low-dose total-body X irradiation. *Radiat Res* 146(5):582-5.
- Ito M, Shibamoto Y, Ayakawa S, Tomita N, Sugie C, Ogino H. 2007. Low-dose whole-body irradiation induced radioadaptive response in C57BL/6 mice. *J Radiat Res* 48(6):455-60.
- Jagger J. 1998. Natural background radiation and cancer death in Rocky Mountain states and Gulf Coast states. *Health Phys* 75(4):428-30.
- Jeggo P, Loblrich M. 2006. Radiation-induced DNA damage responses. *Radiat Prot Dosimetry* 122(1-4):124-7.
- Joiner MC, Lambin P, Malaise EP, Robson T, Arrand JE, Skov KA, Marples B. 1996. Hypersensitivity to very-low single radiation doses: its relationship to the adaptive response and induced radioresistance. *Mutat Res* 358(2):171-83.
- Joiner MC, Lambin P, Marples B. 1999. Adaptive response and induced resistance. *C R Acad Sci III* 322(2-3):167-75.
- Kadhim MA, Moore SR, Goodwin EH. 2004. Interrelationships amongst radiation-induced genomic instability, bystander effects, and the adaptive response. *Mutat Res* 568(1):21-32.
- Kellerer AM, Rossi HH. 1973. The biophysical properties of 3.9-GeV nitrogen ions. VI. Interpretation of results. *Radiat Res* 55(3):447-56.
- Kilemade M, Lemon J, Boreham D. 2008. Characteristics of the adaptive response in cultured salmon cells exposed to ionizing radiation. *Environ Mol Mutagen* 49(3):165-72.

- Kleczkowska HE, Althaus FR. 1996. The role of poly(ADP-ribosyl)ation in the adaptive response. *Mutat Res* 358(2):215-21.
- Kotzerke J, Oehme L. 2010. [Biological aspects of radiation in nuclear medicine]. *Nuklearmedizin* 49 Suppl 1:S5-S10.
- Kumar C, Shetake N, Desai S, Kumar A, Samuel G, Pandey BN. 2016. Relevance of radiobiological concepts in radionuclide therapy of cancer. *Int J Radiat Biol* 92(4):173-86.
- Lee YJ, Park GH, Cho HN, Cho CK, Park YM, Lee SJ, Lee YS. 2002. Induction of adaptive response by low-dose radiation in RIF cells transfected with Hspb1 (Hsp25) or inducible Hspa (Hsp70). *Radiat Res* 157(4):371-7.
- Liu Z, Chen H, Yang H, Liang J, Li X. 2012. Low-Dose UVA Radiation-Induced Adaptive Response in Cultured Human Dermal Fibroblasts. *International Journal of Photoenergy* 2012:11.
- Luckey TD. 1999. Nurture with ionizing radiation: a provocative hypothesis. *Nutr Cancer* 34(1):1-11.
- Lundh C, Lindencrona U, Postgard P, Carlsson T, Nilsson M, Forssell-Aronsson E. 2009. Radiation-induced thyroid stunning: differential effects of (123)I, (131)I, (99m)Tc, and (211)At on iodide transport and NIS mRNA expression in cultured thyroid cells. *J Nucl Med* 50(7):1161-7.
- Marples B, Collis SJ. 2008. Low-Dose Hyper-Radiosensitivity: Past, Present, and Future. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 70(5):1310-1318.
- Matsumoto H, Hamada N, Takahashi A, Kobayashi Y, Ohnishi T. 2007a. Vanguard of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses. *J Radiat Res* 48(2):97-106.
- Matsumoto H, Takahashi A, Ohnishi T. 2004. Radiation-induced adaptive responses and bystander effects. *Biol Sci Space* 18(4):247-54.
- Matsumoto H, Takahashi A, Ohnishi T. 2007b. Nitric oxide radicals choreograph a radioadaptive response. *Cancer Res* 67(18):8574-9.
- Mitchel RE. 2010. The dose window for radiation-induced protective adaptive responses. *Dose Response* 8(2):192-208.

- Miura Y. 2004. Oxidative stress, radiation-adaptive responses, and aging. *J Radiat Res* 45(3):357-72.
- Mohankumar MN, Venkatachalam P, Prabhu BK, Jeevanram RK. 2000. Comparison of UV-induced unscheduled DNA synthesis in lymphocytes exposed to low doses of ionising radiation in vivo and in vitro. *Mutat Res* 447(2):199-207.
- Monsieurs MA, Thierens HM, Vral AM, Van De Wiele C, De Ridder LI, Dierckx RA. 2000. Adaptive response in patients treated with <sup>131</sup>I. *J Nucl Med* 41(1):17-22.
- Monteiro Gil O, Oliveira NG, Rodrigues AS, Laires A, Ferreira TC, Limbert E, Rueff J. 2002. Possible transient adaptive response to mitomycin C in peripheral lymphocytes from thyroid cancer patients after iodine-131 therapy. *Int J Cancer* 102(6):556-61.
- Morales-Ramirez P, Mendiola-Cruz MT. 2004. Kinetics of the early adaptive response to gamma rays: induction of a cellular radioprotective mechanism in murine leukocytes in vivo. *Biosci Rep* 24(6):609-16.
- Morgan WF. 2003. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiat Res* 159(5):567-80.
- Mortazavi SM, Cameron JR, Niroomand-rad A. 2003. Adaptive response studies may help choose astronauts for long-term space travel. *Adv Space Res* 31(6):1543-51.
- Mossman KL. 1998. The linear no-threshold debate: where do we go from here? *Med Phys* 25(3):279-84; discussion 300.
- Mossman KL, Ledesma LM. 1999. Radiation exposure and adaptive processes. *Hum Exp Toxicol* 18(7):436-9.
- Mulcahy RT, Rosenkrans WA, Jr., Penney DP, Cooper RA. 1985. The growth and morphology of FRTL-5 thyroid epithelial cells grown as multicellular spheroids in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 21(9):513-20.
- Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. 2005. Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med* 110:21-8.
- Murley JS, Kataoka Y, Miller RC, Li JJ, Woloschak G, Grdina DJ. 2011. SOD2-mediated effects induced by WR1065 and low-dose ionizing radiation on micronucleus formation in RKO human colon carcinoma cells. *Radiat Res* 175(1):57-65.



- Murray D, McEwan AJ. 2007. Radiobiology of systemic radiation therapy. *Cancer Biother Radiopharm* 22(1):1-23.
- Norden MM, Larsson F, Tedelind S, Carlsson T, Lundh C, Forssell-Aronsson E, Nilsson M. 2007. Down-regulation of the sodium/iodide symporter explains <sup>131</sup>I-induced thyroid stunning. *Cancer Res* 67(15):7512-7.
- Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. 1984. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 223(4636):594-7.
- Pan Y, Yuan D, Zhang J, Xu P, Chen H, Shao C. Cadmium-Induced Adaptive Response in Cells of Chinese Hamster Ovary Cell Lines with Varying DNA Repair Capacity. Radiation Research Society: Radiation Research Society.
- Park HM, Perkins OW, Edmondson JW, Schnute RB, Manatunga A. 1994. Influence of diagnostic radioiodines on the uptake of ablative dose of iodine-131. *Thyroid* 4(1):49-54.
- Pouget JP, Mather SJ. 2001. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur J Nucl Med* 28(4):541-61.
- Raaphorst GP, Boyden S. 1999. Adaptive response and its variation in human normal and tumour cells. *Int J Radiat Biol* 75(7):865-73.
- Rigaud O. 1999. The adaptive response to ionizing radiation: low dose effects unpredictable from high dose experiments. *Hum Exp Toxicol* 18(7):443-6.
- Sannino A, Zeni O, Romeo S, Massa R, Gialanella G, Grossi G, Manti L, Vijayalaxmi, Scarfi MR. 2014. Adaptive response in human blood lymphocytes exposed to non-ionizing radiofrequency fields: resistance to ionizing radiation-induced damage. *J Radiat Res* 55(2):210-7.
- Schaffer M, Schwarz SB, Kulka U, Busch M, Duhmke E. 2004. Adaptive doses of irradiation- an approach to a new therapy concept for bladder cancer? *Radiat Environ Biophys* 43(4):271-6.
- Schlade-Bartusiak K, Stembalska-Kozłowska A, Bernady M, Kudyba M, Sasiadek M. 2002. Analysis of adaptive response to bleomycin and mitomycin C. *Mutat Res* 513(1-2):75-81.

- Schwarz SB, Schaffer PM, Kulka U, Ertl-Wagner B, Hell R, Schaffer M. 2008. The effect of radio-adaptive doses on HT29 and GM637 cells. *Radiat Oncol* 3:12.
- Seong J, Suh CO, Kim GE. 1995. Adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of gamma rays in human cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 33(4):869-74.
- Shadley JD, Wiencke JK. 1989. Induction of the Adaptive Response by X-Rays Is Dependent on Radiation Intensity. *International Journal of Radiation Biology* 56(1):107-118.
- Shimizu T, Kato T, Jr., Tachibana A, Sasaki MS. 1999. Coordinated regulation of radioadaptive response by protein kinase C and p38 mitogen-activated protein kinase. *Exp Cell Res* 251(2):424-32.
- Sisson JC, Avram AM, Lawson SA, Gauger PG, Doherty GM. 2006. The so-called stunning of thyroid tissue. *J Nucl Med* 47(9):1406-12.
- Spitzweg C. 2003. [The sodium-iodide symporter. Pathophysiologic, diagnostic and therapeutic significance]. *Internist (Berl)* 44(4):396-402, 404-8, 410-1.
- Stoilov LM, Mullenders LH, Darroudi F, Natarajan AT. 2007. Adaptive response to DNA and chromosomal damage induced by X-rays in human blood lymphocytes. *Mutagenesis* 22(2):117-22.
- Takahashi A, Matsumoto H, Ohnishi T. 2008. Hdm2 and nitric oxide radicals contribute to the p53-dependent radioadaptive response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71(2):550-8.
- Takahashi A, Ohnishi K, Asakawa I, Kondo N, Nakagawa H, Yonezawa M, Tachibana A, Matsumoto H, Ohnishi T. 2001. Radiation response of apoptosis in C57BL/6N mouse spleen after whole-body irradiation. *Int J Radiat Biol* 77(9):939-45.
- Takahashi A, Ohnishi T. 2009. Molecular mechanisms involved in adaptive responses to radiation, UV light, and heat. *J Radiat Res* 50(5):385-93.
- Van Sande J, Massart C, Beauwens R, Schoutens A, Costagliola S, Dumont JE, Wolff J. 2003. Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology* 144(1):247-52.
- Vares G, Wang B, Tanaka K, Kakimoto A, Eguchi-Kasai K, Neno M. 2011. Mutagenic adaptive response to high-LET radiation in human lymphoblastoid cells exposed to X-rays. *Mutat Res* 706(1-2):46-52.
- Waldren CA. 2004. Classical radiation biology dogma, bystander effects and paradigm shifts. *Hum Exp Toxicol* 23(2):95-100.

- Wang B, Tanaka K, Vares G, Shang Y, Fujita K, Ninomiya Y, Nakajima T, Eguchi-Kasai K, Neno M. 2010. X-ray-induced radioresistance against high-LET radiations from accelerated heavy ions in mice. *Radiat Res* 174(4):532-6.
- Wang ZQ, Saigusa S, Sasaki MS. 1991. Adaptive response to chromosome damage in cultured human lymphocytes primed with low doses of X-rays. *Mutat Res* 246(1):179-86.
- Wei LX, Zha YR, Tao ZF, He WH, Chen DQ, Yuan YL. 1990. Epidemiological investigation of radiological effects in high background radiation areas of Yangjiang, China. *J Radiat Res* 31(1):119-36.
- Wendisch M. 2010. Nachweis der adaptiven Antwort nach Bestrahlung von Schilddrüsenzellen mit offenen Radionukliden. Technische Universität, Medizinische Fakultät Dresden, Dissertation.
- Wojcik A, Sauer C, Zolzer F, Bauch T, Muller WU. 1996. Analysis of DNA damage recovery processes in the adaptive response to ionizing radiation in human lymphocytes. *Mutagenesis* 11(3):291-7.
- Wolff S. 1996. Aspects of the adaptive response to very low doses of radiation and other agents. *Mutat Res* 358(2):135-42.
- Wolff S, Afzal V, Wiencke JK, Olivieri G, Michaeli A. 1988. Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiations become refractory to high doses of radiation as well as to chemical mutagens that induce double-strand breaks in DNA. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 53(1):39-47.
- Yu BP, Chung HY. 2006. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mech Ageing Dev* 127(5):436-43.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. 2003. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(2):H579-88.
- Zhou PK, Rigaud O. 2001. Down-regulation of the human CDC16 gene after exposure to ionizing radiation: a possible role in the radioadaptive response. *Radiat Res* 155(1 Pt 1):43-9.



## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Versuchsablauf Adaptive Antwort.....	10
Abb. 2:	Überlebensfraktionen von FRTL-5 Zellen nach Röntgenbestrahlung in An- oder Abwesenheit von Perchlorat in Abhängigkeit von der Dosis. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung sowie der linear quadratische Kurvenfit. ....	16
Abb. 3:	Überlebensfraktionen von FRTL-5 Zellen nach Bestrahlung durch $^{99m}\text{Tc}$ mit und ohne Perchloratinkubation in Abhängigkeit von der zugegebenen Aktivität. Es sind jeweils die Mittelwerte aus 3 Versuchen und deren gepoolte Standardabweichung dargestellt.....	18
Abb. 4:	Dargestellt sind die Überlebensfraktionen nach Röntgenbestrahlung der FRTL-5 Zellen in Abhängigkeit von der Vorbestrahlungsdosis. In Bild A wurde nach 4 h, in Bild B nach 6 h und in Bild C nach 24 h mit 2 Gy folgebestrahlt. Abgebildet sind Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (* $p \leq 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen. ....	20
Abb. 5:	Dargestellt sind die Überlebensfraktionen nach Röntgenbestrahlung der FRTL-5 Zellen in Abhängigkeit von den Erholungszeitintervallen. Zu jedem Zeitpunkt wird eine vorbestrahlte mit einer nicht vorbestrahlten Probe verglichen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (* $p \leq 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen. ....	21
Abb. 6:	Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der FRTL-5 Zellen nach Vor- und Nachbestrahlung mit $^{99m}\text{Tc}$ und jeweiliger Vorinkubation mit Perchlorat in Abhängigkeit von der Vorbestrahlungsdosis. Die nach 6 h Erholungszeit applizierte Nachbestrahlungsdosis betrug 1 Gy. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (* $p \leq 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen. ....	24
Abb. 7:	Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der FRTL-5 Zellen nach Vor- und Nachbestrahlung mit $^{99m}\text{Tc}$ und jeweiliger Vorinkubation mit Perchlorat in Abhängigkeit von den Erholungszeitintervallen. Zu jedem Zeitpunkt wird eine	

- vorbestrahlte mit einer nicht vorbestrahlten Probe verglichen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen.....25
- Abb. 8: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der FRTL-5 Zellen nach zweimaliger Bestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  in Abhängigkeit von der Vorbestrahlungsdosis. Die nach 6 h Erholungszeit applizierte Nachbestrahlungsdosis betrug 2 Gy. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen.....27
- Abb. 9: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der FRTL-5 Zellen nach Vor- und Nachbestrahlung mit  $^{99m}\text{Tc}$  in Abhängigkeit von den Erholungszeitintervallen. Zu jedem Zeitpunkt wird eine vorbestrahlte mit einer unvorbestrahlten Probe verglichen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen. ....28
- Abb. 10: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der FRTL-5 Zellen in Abhängigkeit von der durch die Röntgenröhre applizierten Vorbestrahlungsdosis. In Bild A wurde nach 4 h, in Bild B nach 6 h und in Bild C nach 24 h mit  $^{99m}\text{Tc}$  (2 Gy) nachbestrahlt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen.....30
- Abb. 11: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der FRTL-5 Zellen in Abhängigkeit von der Vorbestrahlungsdosis (Röntgenstrahlung). In Bild A wurde nach 4 h, in Bild B nach 6 h und in Bild C nach 24 h mit  $^{99m}\text{Tc}$  und Perchlorat (1 Gy) nachbestrahlt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen.....32
- Abb. 12: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der FRTL-5 Zellen in Abhängigkeit von der durch  $^{99m}\text{Tc}$  applizierten Vorbestrahlungsdosis. In Bild A wurde nach 4 h, in Bild B nach 6 h und in Bild C nach 24 h mit der Röntgenröhre (2 Gy) nachbestrahlt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen.....34

- Abb. 13: Dargestellt sind die Überlebensfraktionen der mit Perchlorat vorinkubierten FRTL-5 Zellen in Abhängigkeit von der durch  $^{99m}\text{Tc}$  applizierten Vorbestrahlungsdosis. In Bild A wurde nach 4 h, in Bild B nach 6 h und in Bild C nach 24 h mit der Röntgenröhre (2 Gy) nachbestrahlt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und die signifikanten (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Zellen. ....36
- Abb. 14: Dargestellt ist der Uptake pro 0,25 Mio. FRTL-5 Zellen in Abhängigkeit von der durch die Röntgenröhre applizierten Vorbestrahlungsdosis nach 4 h; 6 h und 24 h Erholungszeit. In Bild A wurde mit 9,14 MBq/2 ml  $^{99m}\text{Tc}$  und in Bild B mit 500 MBq/2 ml  $^{99m}\text{Tc}$  und Perchlorat nachbestrahlt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen, deren gepoolte Standardabweichung und signifikante (\*  $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Proben. ....38

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Variation der Dosisleistung an der Röntgenröhre.....	5
Tab. 2:	Variation der Bestrahlungszeiten an der Röntgenröhre (Stromstärke: 20 mA, Dosisleistung: 1,235 Gy/min).....	9
Tab. 3:	Dosispunkte und Aktivitäten der Dosis-Wirkungskurven .....	9
Tab. 4:	Dosispunkte und Erholungszeiten der Versuche zur Titration der Vorbestrahlungsdosis .....	11
Tab. 5:	Dosispunkte und Erholungszeiten der Versuche zur Titration der Erholungszeit ..	12
Tab. 6:	Dosispunkte und Erholungszeiten der Adaptiven Antwort mit kombinierten Strahlenqualitäten.....	13
Tab. 7:	Nach 2.1.2.3 berechnete Dosen nach einstündiger $^{99m}\text{Tc}$ Bestrahlung mit und ohne Perchlorat .....	17
Tab. 8:	Bestrahlungsdauer der Vorbestrahlungsdosen bei 2 mA Stromstärke und 0,1235 Gy/min .....	19
Tab. 9:	Dargestellt sind die errechneten Vorbestrahlungsdosen, die sich aus einer einstündigen Bestrahlung mit den angegebenen Aktivitäten $^{99m}\text{Tc}$ nach Vorinkubation mit 50 $\mu\text{l}$ Perchlorat ergeben. ....	23
Tab. 10:	Dargestellt sind die errechneten Vorbestrahlungsdosen, die sich aus einer einstündigen Bestrahlung mit den angegebenen Aktivitäten $^{99m}\text{Tc}$ ergeben.....	26



## 8.3 Materialien

### 8.3.1 Reagenzien

#### 8.3.1.1 Chemikalien

Accutase	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
BSA	Sigma, München, Deutschland
Ethanol 80 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	Mallincrodt Baker D.V., Deventer, Niederlande
Kristallviolett	Fluka, Steinheim, Deutschland
Methanol	VWR International, Darmstadt, Deutschland
NaCl 0,9 %, isotonisch	Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumperchlorat-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland

#### 8.3.1.2 Grundmedien und Medienzusätze

Gibco F12	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
FKS	Sigma-Aldrich GmbH, Deisendorf
Gly-His-Lys	Sigma-Aldrich GmbH, Deisendorf
Hydrocortison	Sigma-Aldrich GmbH, Deisendorf
Insulin (bovine)	Biochrom KG, Heidelberg
Somatostatin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisendorf
Transferrin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisendorf

#### 8.3.1.3 Lösung für den Koloniebildungstest

Kristallviolett-Arbeitslösung (500 ml)	5 g Kristallviolett in 50 ml Methanol gelöst in 500 ml mit dH <sub>2</sub> O
-------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------

#### 8.3.1.4 Medienzusammensetzung

Kulturmedium Gibco F12	Gebrauchslösung:	5 % FKS 10 ng/ml Gly-His-Lys 10 nM Hydrocortison 10 g/ml Insulin 10 ng/ml Somatostatin 5 µg/ml Transferrin 10 mU/ml TSH
Kryomedium	Kulturmedium Gibco F12:	25 % FKS 20 % DMSO

**8.3.2 Zelllinie**

FRTL-5	Cell Lines Service, Eppelheim (CRL 8305 von der American Type Culture Collection)
--------	--------------------------------------------------------------------------------------

**8.3.3 Strahlenqualitäten**

## 8.3.3.1 Röntgenstrahlung

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

Röntgenröhre und Dosisleistungsmessgerät im OncoRay

(Zentrum für Innovationskompetenz, Medizinische Fakultät, TU Dresden)

## 8.3.3.2 Radionuklide

$^{99m}\text{Tc}$ -Pertechnetat	$^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Generator: UltraTechnekow FM, Covidien Deutschland GmbH, Neustadt, Deutschland
---------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**8.3.4 Geräte und sonstige Materialien**

## 8.3.4.1 Geräte

Zellbank	HERA safe	Heraeus instruments, Düsseldorf, Deutschland
Brutschrank	CB 150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifugen	UNIVERSAL 32R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland Zentrifugen
	Biofuge primo R	Heraeus instruments, Düsseldorf, Deutschland
	Microcentrifuge MC-13	Heraeus instruments, Düsseldorf, Deutschland Schüttler
	Multi Reax	Heidolph, Kelheim
$\gamma$ -Counter (Cobra™ II)	Auto-gamma, Packard®	Canberra GmbH, Rüsselsheim, Deutschland
Lichtmikroskop	CK 2	Olympus-GmbH, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer		Neubauer bright-line, Marienfeld, Deutschland

## 8.3.4.2 Sonstige Materialien

6-Well Mikrotiterplatten	Nunc, VWR International, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen	Nunc, VWR International, Darmstadt, Deutschland
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Falconröhrchen	Greiner bio one, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten	Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Accujet	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilfilter	MillexR-GS 0,22 µm: Millipore, Carrigtwohill, Irland

## **Anlage 1:**

# **Erklärung zur Eröffnung des Promotionsverfahrens**

**Technische Universität Dresden**

**Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus**

**Promotionsordnung vom 24. Juli 2011**

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.
2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich die Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:  
PD Dr. med. Klaus Zöphel  
Prof. Dr. med. Jörg Kotzerke  
Dr. rer. medic. Roswitha Runge  
Dr. rer. medic. Liane Oehme  
Dr. rer. nat. Robert Freudenberg
3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.
5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgender Form veröffentlicht: noch nicht erfolgt
6. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.
7. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.
8. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.

Dresden, den

Susanne Schweitzer

## Anlage 2

**Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation**

- das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen (*entfällt*)
- die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde zum Vorhaben/zur Mitwirkung (*entfällt*)
- die Einhaltung des Gentechnikgesetzes (*entfällt*)
- die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Dresden, den

Susanne Schweitzer

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum erfolgreichen Abschluss meiner Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Klaus Zöphel für die Vergabe des interessanten Forschungsthemas und die Betreuung der Dissertation.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Jörg Kotzerke für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit.

Von Herzen möchte ich mich bei Frau Dr. Roswitha Runge für ihr unverzichtbares Engagement, ihre Geduld und ihre fachliche Unterstützung bedanken.

Vielen Dank an Dr. Robert Freudenberg für die fachliche Unterstützung bei den dosimetrischen Fragestellungen der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich Rita Oertel für die sorgsame Einarbeitung im Labor und die stets freundliche Zusammenarbeit danken.

Ich danke dem OncoRay (Zentrum für Innovationskompetenz, Medizinische Fakultät, TU Dresden) für die Bereitstellung der Röntgenröhre.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden für ihren geduldigen Rückhalt, ihre offenen Ohren und ihr Verständnis bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und mir während der Anfertigung der Doktorarbeit immer unterstützend und liebevoll zur Seite standen. Ich danke meiner Mama für ihre unendliche Ruhe und Geduld beim akribischen Korrekturlesen und beim Lösen der Formatierungsknoten.