

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



Wertigkeit des Comet Assays zur Detektion von Radioprotektion

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

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

von Arndt-Christian Müller
geboren am 18. Februar 1975 in Merseburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Dunst
 2. Prof. Dr. W. Wohlrab
 3. Prof. Dr. M. Flentje (Würzburg)
Verteidigung: 16.03.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006555

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006555>]

Referat

Zur Optimierung der Strahlentherapie zählt neben einer Verbesserung der Tumorkontrolle auch eine Reduzierung von Nebenwirkungen. In den letzten Jahrzehnten wurden In-vitro-Assays etabliert, um schwere unerwünschte Reaktionen von Normalgewebe auf Bestrahlung prätherapeutisch erkennen zu können. In dieser Arbeit wurde der Comet Assay als prädiktiver Test zur Messung der Strahlenempfindlichkeit von Einzelzellen (Gesamtblut und isolierte Lymphozyten) unter dem Einfluß des Radioprotektivums Amifostin verwendet.

Bei Untersuchungen zur Güte des alkalischen Comet Assays waren die Meßergebnisse innerhalb eines Experiments jederzeit reproduzierbar. DNS-Schadens-Messungen mit Blutproben eines Spenders zu verschiedenen Zeitpunkten belegten die sichere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Zeitdifferenzen der Probengewinnung bis zu einem Monat. Dabei wiesen isolierte Lymphozyten vergleichbare Initialschäden, höhere Basalschäden und eine kleinere Reparaturkapazität gegenüber Gesamtblut auf, so daß zur Vergleichbarkeit von Experimenten gleiche Zellarten verwendet werden sollten.

Die Untersuchungen zur Radioprotektion durch Amifostin ergaben, daß das Prodrug Amifostin selbst keine radioprotektiven Effekte vermittelte. 1 U/ml alkalische Phosphatase reichten zur Aktivierung von 100 µg/ml Amifostin in vitro bei isolierten Lymphozyten aus. Eine Radioprotektion durch aktiviertes Amifostin war nach Gabe der Substanz in vivo und in vitro meßbar. Die berechneten dosismodifizierenden Faktoren (DMF) waren probanden- bzw. patientenspezifisch aber unabhängig von der Höhe der Energiedosis und ließen sich in vitro bei höheren Amifostinkonzentrationen nur geringgradig steigern. Ein zusätzlicher, die Reparatur beschleunigender Effekt durch Amifostin ist inkonstant verzeichnet worden. Die Konzentration der alkalischen Phosphatase von Endothel und Serum könnte bei Übertragbarkeit der In-vitro-Resultate ausreichen, um Amifostin schon in der Blutbahn zu aktivieren. Der Enzymkonzentrationsgradient zwischen Tumor- und Normalgewebe wäre demzufolge kein Selektionsfaktor für die Präferenz von normalem Gewebe durch Amifostin. Der Comet Assay ist geeignet, Radioprotektion zu detektieren. Die relativ schnelle Durchführbarkeit und einfache Gewinnung von Untersuchungsmaterial zeigen die Möglichkeit einer Integration des Tests in die klinische Routinediagnostik auf.

Bibliographische Beschreibung

Müller, Arndt-Christian: Wertigkeit des Comet Assays zur Detektion von Radioprotektion.
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2003

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Radiosensitivität und ihre Prädiktion mit dem Comet Assay	1
1.2 Radioprotektion durch Amifostin.....	2
1.3 Zielstellung der Arbeit	4
2 Methodik	5
2.1 Aufbau und Entwicklung des Comet Assays	5
2.2 Zellgewinnung.....	6
2.2.1 Blutzellen	6
2.2.2 Lymphozytenseparation	7
2.3 Zellanzahlbestimmung	7
2.3.1 Blutzellen	7
2.3.2 Lymphozyten.....	8
2.4 Beschichtung	8
2.5 Schadensinduktion durch Bestrahlung.....	9
2.6 Reparatur	9
2.7 Lysis	9
2.8 Entwinden und Elektrophorese	10
2.9 Neutralisation	10
2.10 Computergestützte Auswertung nach Fluoreszenzfärbung.....	10
2.10.1 Fluoreszenzfärbung	10
2.10.2 Messung der Kometen.....	11
2.10.3 Meßparameter.....	11
2.11 Patienten- und Probandencharakteristik.....	14
2.11.1 Probandengruppe.....	14
2.11.2 Patientengruppe	14
2.12 Statistische Auswertung	15
3 Ergebnisse	16
3.1 Evaluierung des Comet Assays	16
3.1.1 Reproduzierbarkeit bei gleichartig erstellten Präparaten	16
3.1.2 Reproduzierbarkeit der Reparatur nach Bestrahlung	17
3.1.3 Reproduzierbarkeit zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....	19
3.1.4 Fluoreszenzmikroskopische Schadensmanifestation	21
3.1.5 Einfluß der Agaroselösungsmittel.....	22
3.1.6 Radiosensitivität bei isolierten Lymphozyten und dem Gesamtblut.....	23

3.2	Amifostin in vitro	26
3.2.1	Wirkung des Prodrugs Amifostin bei kernhaltigen Blutzellen	26
3.2.2	Wirkung von aktiviertem Amifostin an frisch isolierten Lymphozyten	28
3.3	Amifostin in vivo	39
4	Diskussion	41
4.1	Reproduzierbarkeit des Comet Assays.....	41
4.1.1	Auswahl der Meßparameter	41
4.1.2	Reparatur	43
4.1.3	Wiederholbarkeit innerhalb eines Experiments	44
4.1.4	Wiederholbarkeit der Experimente zu verschiedenen Zeitpunkten	44
4.1.5	Fluoreszenzmikroskopische Schadensmanifestation und Bildanalyse	46
4.1.6	Agaroseeinfluß und Präparation.....	47
4.1.7	Radiosensitivität bei isolierten Lymphozyten und dem Gesamtblut.....	47
4.2	Amifostin in vitro	49
4.2.1	Wirkung des Prodrugs Amifostin bei kernhaltigen Zellen.....	49
4.2.2	Alkalische Phosphatase	50
4.2.3	Amifostin.....	52
4.3	Dosismodifikation durch Amifostin.....	53
4.4	Klinische Anwendung und Perspektive von Amifostin	57
4.5	Wertigkeit des Comet Assays	57
5	Zusammenfassung.....	60
6	Literaturverzeichnis.....	62
7	Anlagen.....	74
7.1	Material	74
7.1.1	Zellgewinnung.....	74
7.1.2	Zellanzahlbestimmung	74
7.1.3	Bestrahlung.....	74
7.1.4	Comet Assay	74
7.1.5	Verbrauchsmaterial	77
7.2	Geräte	77
8	Thesen.....	78
	Lebenslauf	
	Selbständigkeitserklärung	
	Publikationsliste	
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
	Danksagung.....	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APR	Abdominoperineale Rektumamputation
Aqua dest.	Aqua destillata
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
D	Energiedosis in Gray [Gy]
df	Freiheitsgrad
DMF	(Energie)-Dosis modifizierender Faktor
DMF-MW	Mittelwert des (Energie)-Dosis modifizierender Faktors
DMF-P	(Energie)-Dosis modifizierender Faktor patientenbezogen
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNS im Schweiß [%]	prozentualer Fluoreszenzanteil der DNS im Schweiß, auch als % tail DNA bezeichnet
DRF	Dosisreduktionsfaktor, Reziproke des DMF
FKS	Fetales Kälberserum
G	histopathologisches Grading
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
kb	Kilobasen
LD	letale Dosis
LMP-Agarose	Low-Melting-Point-Agarose
M	Fernmetastasen
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
MW	Mittelwert
MWI	Mittelwert der Initialschäden
MWR	Mittelwert der Residualschäden
NFκB	nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B
OP	Operationstechnik
PBS	Phosphate Buffered Saline
pN	Nodi = regionäre Lymphknotenmetastasen, pathologisch klassifiziert
pT	Primärtumor, pathologisch klassifiziert
R	Residualtumor

RNS	Ribonukleinsäure
RPMI-Medium	ein 1966 von Moore und Mitarbeitern im Roswell Park Memorial Institute (RPMI) entwickeltes Kulturmedium
SD	Standardabweichung
Sig.	Signifikanz
St.	Stadium
T	Prüfgröße
Tab.	Tabelle
TAR	Tiefe anteriore Rektumresektion
u.a.	und andere
u.a.m.	und andere mehr
u.v.m.	und viele mehr
WR	Walter Reed
WR-1065	aktives Thiol, welches durch Dephosphorylierung aus dem Prodrug Amifostin WR-2721 entsteht
WR-2721	Prodrug Amifostin
WR-33278	symmetrisches Disulfid von Amifostin, Metabolit

1.1 Radiosensitivität und ihre Prädiktion mit dem Comet Assay

In der Medizin sind Wirkung und Nebenwirkung ständige Begleiter bei der Behandlung von Krankheiten. Für die Pharmakologie formulierte Paracelsus es als Axiom: „Alle Dinge sind ein Gift und nichts ist ohne Gift, nur die Dosis bewirkt, dass ein Ding kein Gift ist“ [6].

In der Strahlentherapie gehen gewünschte Therapieeffekte mit unerwünschten akuten und chronischen Nebeneffekten einher. Am Anfang des letzten Jahrhunderts nutzte man eine radiogene Nebenwirkung - das Erythem - durch Einteilung in Hautrötungsgrade zur Abschätzung der Strahlendosis.

Die ersten radiobiologischen Untersuchungen zu Akut- und Spätnebenwirkungen von Bestrahlung führten Reisner und Miescher in den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts durch [113]. In den vergangenen Jahrzehnten rückte dieses Thema immer stärker in den Blickpunkt der Forschung, nachdem bei vielen Tumorentitäten die Strahlentherapie bezüglich der Fraktionierung, der Wahl der Einzeldosis, des Zeitfaktors (Behandlungsdauer) und weiterer Aspekte in Hinsicht auf ihre Wirkung optimiert wurde. Prädiktive Tests wurden konzipiert, um die Radiosensitivität von Tumor und Normalgewebe, also Therapieeffekt und Verträglichkeit einer Bestrahlung, vorhersagen zu können. Die Untersuchungen wurden auf die Testung von Chemotherapeutika, Radioprotektoren und -sensitizern, Umweltgiften und weiteren Substanzen ausgeweitet. Die Erholungsfähigkeit von Geweben nach diesen zellmodulierenden Ereignissen kann durch Reparaturuntersuchungen ermittelt werden. Letztendlich sollen prädiktive Untersuchungen in vitro wegweisend für eine Individualisierung und weitere Optimierung der Therapie in vivo sein.

Als **Radiosensitivität** wird die Empfindlichkeit gegenüber Strahlen bezeichnet. Im engeren Sinne versteht man darunter die Empfindlichkeit der DNS einer Zelle auf Bestrahlung. Die Wirkung von Photonenstrahlung an Zellen (Zellschädigung und Zelltod) wird zu zwei Dritteln über Radikale und Peroxide, die durch die Radiolyse des Wassers entstehen, vermittelt. Ein Drittel der Wirkung erfolgt durch direkte Interaktion [48]. Bei nicht letal geschädigten Zellen können Mutagenese, Transformation und Karzinogenese resultieren. Schäden an Membransystemen oder anderen Zellorganellen als dem Zellkern sind bei der Tumorbehandlung in der Radioonkologie weniger von Bedeutung, da sie bei der gewünschten Auslösung des Zelltodes kaum einfließen. Im Mittelpunkt der Betrachtung steht die DNS.

Aus diesem Grunde wurde neben anderen Verfahren der **Comet Assay** etabliert und weiterentwickelt, da er je nach pH-Wert vorrangig Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche der DNS quantifizieren kann. Bei locker ionisierender Strahlung ist das Verhältnis von

Einzel- zu Doppelstrangbrüchen 20:1 [48]. Aufgrund dieser Relation kann man mit der alkalischen Variante (Einzelstrangbrüche) des Comet Assays schon nach niedrigeren Strahlendosen DNS-Schädigungen detektieren als bei der neutralen Methodik (Doppelstrangbrüche). Deswegen wird die alkalische Version des Comet Assays häufiger als die neutrale angewandt. Isolierte Einzel- oder Doppelstrangbrüche stellen keine letalen Ereignisse für eine Zelle dar. Mehrfachschäden, als bulky lesion, (locally) multiple damaged sites oder clustered damage bezeichnet, können irreparable Läsionen erzeugen [111]. Sie bestehen aus Basenschaden, Strangbruch und Quervernetzung der DNS (crosslink). Durch den Comet Assay können Strangbrüche, Basen- und Zuckerschäden sowie Crosslinks als Summationsschaden erfaßt werden [5,50,62]. Grundsätzlich können aber sowohl Mehrfachschäden als auch DNS-Proteinvernetzungen repariert werden. Wichtigster Mechanismus der letalen biologischen Strahlenwirkung ist der falsch oder nicht reparierte Doppelstrangbruch (Misrepair) [43], der zum Beispiel durch Wechselwirkung benachbarter Radikalnester resultieren kann.

1.2 Radioprotektion durch Amifostin

Nach dem zweiten Weltkrieg erforschte das Walter Reed Army Institute of Research der United States Army radioprotektive Chemikalien, um ihre Soldaten vor den Folgen eines radioaktiven „fall out“ zu schützen [64]. Die potenteste Substanz war das Thiol Amifostin, damals als WR-2721 (WR für Walter Reed) bezeichnet. Da eine intravenöse Applikation für den militärischen Einsatz wenig praktikabel erschien, wurde dieses Projekt nicht weiter verfolgt. Die medizinische Forschung an Amifostin intensivierte sich, als die selektive Protektion von Normalgewebe während zytostatischer Behandlung mit Alkylanzien und Platinverbindungen nachgewiesen werden konnte [36]. In diesem Zusammenhang nahm das Interesse am Einsatz des Thiols als Zytoprotektivum zur Reduktion von Nebenwirkungen am Normalgewebe auch bei der Radiotherapie deutlich zu. Im Ergebnis klinischer Studien wurde Amifostin in Deutschland für wenige Indikationen zugelassen. Die Strahlenschutzsubstanz darf bisher zur Reduktion der hämatologischen Toxizität (Neutropenie) bei der Behandlung des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms mit einer Kombination aus Cyclophosphamid und Cisplatin und in der Strahlentherapie bei Kopf-Hals-Tumoren zum Schutz vor akuter und chronischer Xerostomie klinisch angewandt werden.

Amifostin (WR-2721) ist das phosphorylierte Prodrug des aktiven freien Thiols WR-1065 [93]. Der Prozeß der Aktivierung erfolgt hauptsächlich durch die membrangebundene alkalische Phosphatase und ist in Abb. 1 dargestellt [81].

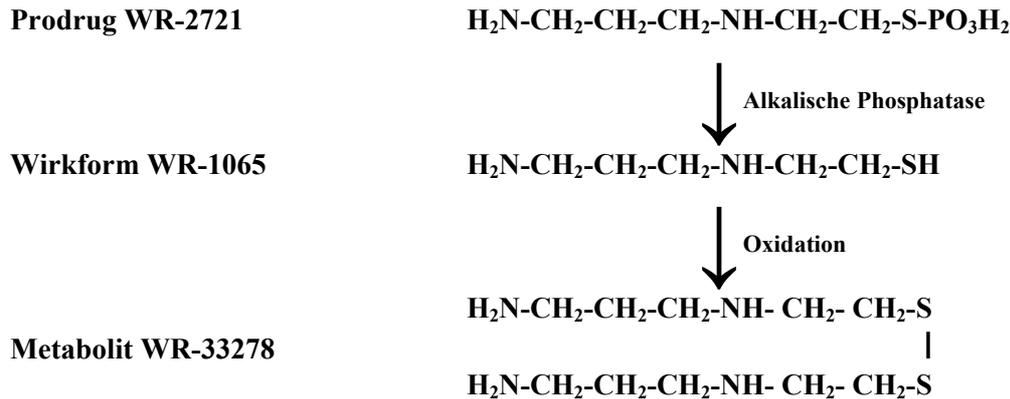


Abb. 1: Metabolismus von Amifostin nach Peters und van der Vijgh [81]

WR-1065 kann weiter zu Disulfiden oxidiert werden (symmetrisches Disulfid WR-33278 oder gemischte Disulfide) mit endogenen Thiolen oder Thiol enthaltenden Proteinen. Solche Disulfide können als austauschbarer Pool für WR-1065 fungieren [52,94]. Die Radioprotektion durch WR-1065 wird mit mehreren Mechanismen beschrieben. Die wichtigsten schließen die Wirkung als Fänger von freien Radikalen, als Wasserstoffdonator zur Reparatur von Radikalen in Molekülen und die Erzeugung von Hypoxie ein [83]. Für die Strahlentherapie ist Amifostin vor allem deshalb von Interesse, da die radioprotektive Substanz das Normalgewebe bevorzugt [114,116]. Die **Selektion** wird durch mehrere Mechanismen wie bei einer Kaskade in Schritten erläutert.

Erster Schritt: Im Gegensatz zu normalem Gewebe ist die Gefäßarchitektur von Tumoren abnormal und teilweise chaotisch [28,61]. Amifostin würde somit bevorzugt in normalem Gewebe anfluten. **Zweiter Schritt:** Das zur Aktivierung nötige Enzym alkalische Phosphatase ist in den meisten Normalgeweben in höheren Konzentrationen vorhanden als in Tumoren. Des weiteren ist in hypoxischen Tumoren ein saures pH-Milieu, welches die Aktivität des Enzyms limitiert (pH-Optimum = 8-10). Diese Faktoren begünstigen die Aktivierung zu WR-1065 an normalen Geweben [20]. **Dritter Schritt:** Die verbesserte Aufnahme von Amifostin in viele Normalgewebe konnte durch Utley et al. gezeigt werden [109]. Unterlegt werden seine Messungen durch die Ergebnisse von Newton et al., der an Spermien nicht nur passive Diffusion, sondern die erleichterte Aufnahme des Pharmakons durch ein Polythioltransportsystem beschrieb [69].

Folgerung: Eine selektive Radioprotektion des Normalgewebes könnte zum einen die Nebenwirkungsrate senken oder zum anderen eine Energiedosiseskalation - bei gleicher Strahlentoleranz des umgebenden Normalgewebes - mit höherer Tumorkontrolle ermöglichen.

1.3

Zielstellung der Arbeit

Der Nutzen des Einsatzes radioprotektiver Pharmaka wie Amifostin während einer Radiochemotherapie wird in klinischen Studien evaluiert, so auch beim Rektumkarzinom [30]. Es wird untersucht, ob akute radiogene Nebenwirkungen (Diarrhoe, Strahlenerythem u.a.), zytostatikabedingte hämatologische Nebenwirkungen (Anämie, Leukopenie, Thrombopenie) als auch zytostatikabedingte nicht-hämatologische Nebenwirkungen (Nausea, Emesis, Mukositis u.a.) mit Amifostin seltener auftreten.

Das strahlentherapeutische Konzept ist darauf ausgerichtet, Nebenwirkungen zu minimieren, um die vollständige Durchführung der Behandlung (durchschnittlicher Zeitrahmen von 6 bis 7 Wochen) zu ermöglichen. Eine Abweichung vom Zeitplan wegen akuter Toxizitäten könnte die lokale Tumorkontrolle einschränken und den Heilungserfolg beeinträchtigen.

Mit dieser Arbeit soll untersucht werden, ob der Comet Assay zur Messung von Radioprotektion geeignet ist. Daraus leiten sich insbesondere folgende Fragestellungen ab:

1. Ist der Comet Assay ein reproduzierbares Verfahren?
2. Ist ein radioprotektiver Effekt durch Amifostin mit dem Comet Assay detektierbar?
3. Läßt sich bei vorhandener Radioprotektion durch Dosiserhöhung die Wirkung von Amifostin steigern?
4. Ist die Radioprotektion bei allen Probanden oder Patienten gleich groß?
5. Eignet sich der Comet Assay als prädiktiver Test?

2

Methodik

2.1

Aufbau und Entwicklung des Comet Assays

Der Comet Assay ist eine Methode zur Messung von DNS-Schäden an humanen, animalen und pflanzlichen Zellen. Da Einzelzellen untersucht werden, wurde diese Technik unter dem Begriff Einzelzellgelelektrophorese (single-cell gel electrophoresis, SCGE) bekannt. Zur Entwicklung dieses Verfahrens trugen die Experimente von Rydberg und Johanson [89] bei, die erstmals DNS-Schäden an einzelnen Zellen untersuchten.

Die grundlegenden Schritte der Prozedur, Lysis und Elektrophorese von in Agarose eingebetteten Zellen, beschrieben Östling und Johanson [78] aus der gleichen Arbeitsgruppe 1984 als Mikroelektrophorese. Das Protokoll wurde von Singh et al. [100] und später von Olive et al. [76] variiert, so daß heute neben der ursprünglichen schwach alkalischen Form eine neutrale und eine alkalische Variante des Comet Assays unterschieden werden. Die pH-Einteilung bezieht sich dabei sowohl auf die Elektrophorese als auch auf die Lysis.

Der Tab. 1 sind die grundlegenden Formen des Comet Assays zu entnehmen. Viele Modifikationen der Basisvorschriften sind im Gebrauch. In Abb. 2 ist der Ablaufplan von neutraler und alkalischer Einzelzellgelelektrophorese dargestellt.

Tab. 1.: Übersicht über den hauptsächlich gemessenen DNS-Schadenstyp im Comet Assay je nach Modifikation des pH-Werts in Lysis und Elektrophorese

Comet Assay etabliert von	Lysis	Elektrophorese	DNS-Schadenstyp
Östling und Johanson [78,79]	schwach alkalisch	neutral	Doppelstrangbrüche
Olive et al. [76]	alkalisch	neutral, schwach alkalisch	Doppelstrangbrüche
Singh et al. [100,101]	alkalisch	alkalisch	Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche, Basenschäden Alkali-labile Seiten

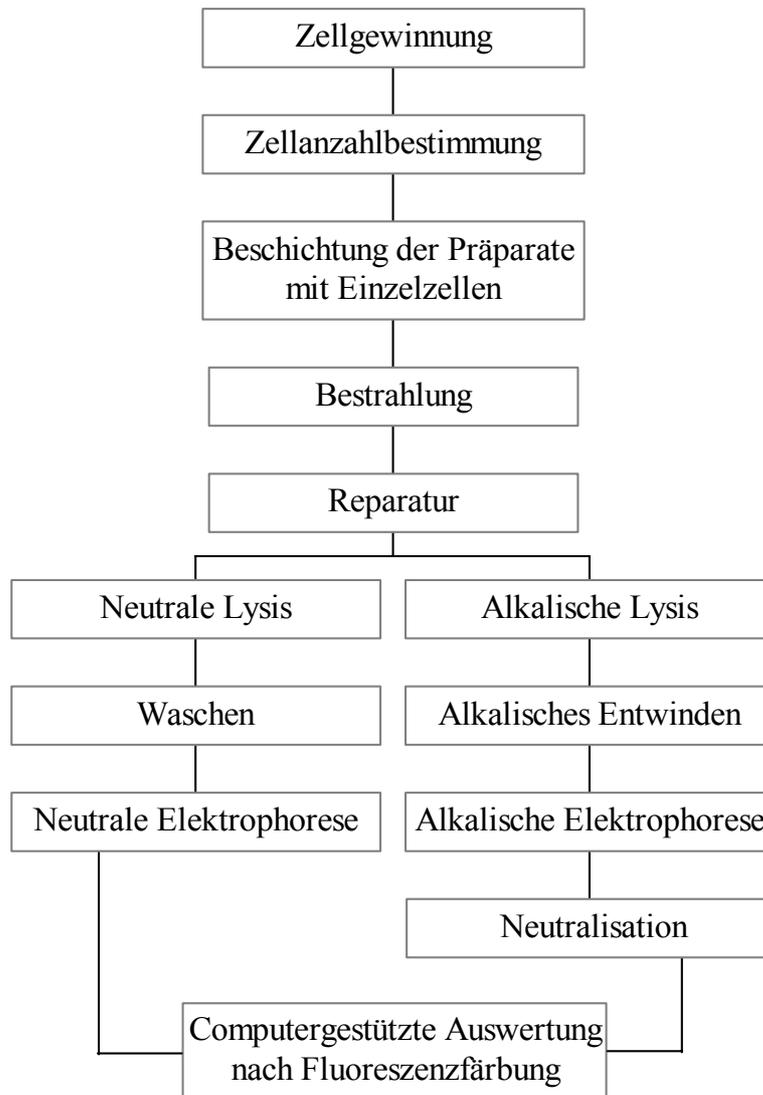


Abb. 2: Ablaufplan des Comet Assays (alkalisch und neutral), modifiziert nach Fairbairn et al. [32]

In dieser Arbeit wurde die bei Singh et al. [101] veröffentlichte alkalische Methode angewandt. Die einzelnen Arbeitsschritte sind im folgenden aufgeführt.

2.2 Zellgewinnung

2.2.1 Blutzellen

Die Blutzellen wurden durch periphervenöse Punktion in einem Zitratröhrchen gewonnen. Wenn der Terminus „Blutzellen“ gebraucht wird, sind alle kernhaltigen Zellen des Blutes, Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten in die Auswertung eingeschlossen. Erythrozyten und Thrombozyten erzeugen lysisbedingt keine Kometenstrukturen (2.10).

2.2.2 Lymphozytenseparation

Die Lymphozyten sind im Institut für Pathophysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg nach dem Prinzip der Dichtegradientenseparation, auch als Ficoll-Hypaque-Technik bekannt, unter sterilen Bedingungen aufgetrennt worden [14]. Nach dem Gewinnen von 30 ml in Zitrat antikoagulierten Blutes wurde dieses mit raumtemperiertem PBS-Puffer im Verhältnis 1:1 gemischt. Vom PBS-Blutgemisch wurden 5 ml über 4 ml Percoll (entspricht Ficoll) in einem Röhrchen überschichtet. Anschließend sind die Röhrchen bei 2600 Upm für 15 Minuten bei ausgeschalteter Zentrifugenbremse (1100xg) zentrifugiert worden.

Die entstandenen Lymphozytenringe wurden in Zentrifugenröhrchen überführt, mit PBS-Puffer zur Waschung aufgefüllt und mit 2000 Upm über 10 Minuten bei eingeschalteter Zentrifugenbremse (700xg) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschvorgang fand mindestens einmal statt bzw. wurde so lange wiederholt, bis der Überstand nicht mehr getrübt war. Das gewonnene Lymphozyten-Zellpellet wurde in 500 µl RPMI-FKS-Medium gelöst. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 75 µl LMP-Agarose gemischt und als mittlere Schicht aufgetragen.

Bei mitogenstimulierten Lymphozyten ist ein unterschiedliches Ansprechen für Energiedosis-Wirkungs-Kurven nach Bestrahlung beschrieben [40,85]. Um die Ergebnisse mit nicht stimulierten Blutzellen vergleichen zu können, wurde auf Phythämagglutinin verzichtet.

2.3 Zellanzahlbestimmung

Die Zellanzahl kernhaltiger Zellen war für den Versuchsablauf entscheidend, da einerseits eine Mindestanzahl von Zellen pro Objektträger vorhanden sein mußte und andererseits eine zu hohe Zelldichte die Abgrenzbarkeit der Schweife bei der Auswertung behindert hätte.

2.3.1 Blutzellen

Um die Zellanzahl und -verteilung der Blutzellen zu bestimmen, wurde für jeden Probanden ein Differentialblutbild erstellt. Über die prozentuale Verteilung der Zellen ließen sich parallel zur Anamnese Faktoren, die mit erhöhtem DNS-Schaden einhergehen (zum Beispiel eine Leukozytose als Hinweis auf Nikotinabusus [27] oder eine Hämatokrieterhöhung durch körperliche Aktivität [41]), eruieren.

Das Blutbild wurde mit dem Hämatologie-System Sysmex K 1000 sofort nach der Blutentnahme erstellt. In dieser Apparatur erfolgte die Bestimmung der Zellanzahl nach dem Widerstandsmeßprinzip, des Hämoglobinwerts über die Zyanhämoglobinmethode und des Hämatokrits durch kumulative Pulshöhensummierung entsprechend dem Laborstandard der Klinik.

2.3.2 Lymphozyten

Zur Zellanzahlbestimmung wurden 50 µl der Lymphozytensuspension mit 500 µl Trypanblau im Verhältnis 1:11 intravital gefärbt und luftblasenfrei in die Neubauerzählkammer gegeben. Ausgezählt wurden zwei Eckquadrate in „L“-Form unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung, wobei zerstörte Zellen - an der dunkelblauen Verfärbung erkennbar - nicht mitgezählt wurden („L“-Form: Zellen, die am Rand der Eckquadrate lagen, sind nur auf der linken Seite und auf der Unterseite berücksichtigt worden). Aus den beschriebenen Verdünnungs- und Auszählungsschritten leitete sich die Formel zur Zellanzahlberechnung ab:

$$\text{Zellanzahl/ml} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor (11)}}{\text{Anzahl ausgezählter Eckquadrate (2)}} \times 10^4$$

Da ein Eckquadrat 0,1 µl entsprach, ergab sich der Faktor 10^4 aus der Umrechnung von Mikroliter in Milliliter ($0,1 \mu\text{l} \times 10^4 = 1 \text{ ml}$). Für eine optimale Auswertung mußten pro Objektträger 1.000-50.000 Zellen [86] enthalten sein.

2.4 Beschichtung

Um die Adhäsion der Agaroseschichten auf den angerauhten Objektträgern zu augmentieren, wurde eine **temporäre Grundsicht** von 1000 µl 1 % Agarose mit PBS je Objektträger aufgetragen. Nach 10 Minuten war die Solschicht zum Gel verfestigt. Mit einem Glasplättchen wurde der über der Aufrauung befindliche Teil abgetragen. Anschließend erfolgte die Präparation der permanenten Gelschichten. Da die Probe von 2 Schichten umgeben ist, nennt man diese Beschichtungsweise auch Sandwichlayertechnik.

300 µl 0,6 % Agarose mit PBS wurden mit einem Deckglas als **Unterschicht** auf den Objektträger gegeben und zur Verfestigung auf Eis gelegt. Zu 1 ml 0,5 % LMP-Agarose mit PBS bzw. RPMI (bei Reparaturversuchen) wurden 45 µl Zitratblut bzw. Lymphozyten in RPMI-FKS-Lösung gegeben.

Nach Durchmischung bei 37 °C wurden 85 µl als **Probenschicht** aufgetragen und in eine Kammer (4-8 °C für 10 Minuten) gelegt. 85 µl 0,5 % LMP-Agarose mit PBS bzw. RPMI (bei Reparaturversuchen) wurden mit einem Deckgläschen versehen, als **Deckschicht** aufgetragen.

2.5 Schadensinduktion durch Bestrahlung

Die Schadensinduktion erfolgte durch Gammastrahlen. Die beschichteten Objektträger (Zellen in der Mittelschicht) wurden auf Eis in den Bestrahlungsraum transportiert, um eine Reparatur von DNS-Schäden während und nach der Strahlenapplikation zu minimieren. Die Objektträger wurden in der Aussparung zwischen zwei gekühlten Piacrylplatten bestrahlt (Spannung: 200 kV, Stromstärke: 20 mA, 0,5 mm Kupferfilter, Tubusgröße 15x20x40 cm). Die Dosisleistung betrug 208,3 cGy/min. Die zu den Energiedosen in Gray gehörenden Bestrahlungszeiten sind in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Darstellung der verwendeten Energiedosen [Gy] mit zugehöriger Zeit [min] bei der Bestrahlung der in Agarose eingebetteten Zellen auf den Objektträgern (Dosisleistung: 208,3 cGy/min).

Energiedosis [Gy]	0,25	0,5	0,7	1,0	2,0	4,0	8,0
Zeit [min]	0,12	0,24	0,34	0,48	0,96	1,92	3,84

Nach der Bestrahlung fanden je nach Protokoll Reparatur oder Lyse statt.

2.6 Reparatur

Die Objektträger wurden ohne Deckgläschen in zuvor auf 37 °C temperierte Gewebekulturplatten mit Reparaturmedium eingebracht und bei dieser Temperatur im Brutschrank für 10, 60 oder 120 Minuten inkubiert.

2.7 Lysis

Nach Entfernung des Deckgläschens im Anschluß an die Bestrahlung bzw. nach der Reparatur wurden die Objektträger in Küvetten für eine Stunde in 4 °C kalte, frisch zubereitete Lysis-Gebrauchslösung getaucht. Durch die Detergentien Triton X und Natrium-Laurylsarkosinat und Hyperosmolarität der Lyselösung erfolgte die Zerstörung von Kern- und Zellmembranen [62]. Um die DNS im Alkalischen entwinden zu können, mußten die DNS-organisierenden Proteine durch hohe Kochsalzkonzentration herausgelöst werden.

In dem von der Agarose gebildeten, den ursprünglichen Zelleib umgebenden Hohlraum, verblieb ein Nukleoid, welches nach Cook und Brazell [25] ein Residuum der ursprünglichen Zellkernstruktur darstellt. Der Lysisvorgang entfernte den gesamten Zellinhalt mit Ausnahme der hochspiralisierten DNS und eines kleinen Teils von Nicht-Histon-Proteinen [86].

2.8 Entwinden und Elektrophorese

Um die DNS-Strukturen zur Wanderung im elektrischen Feld freizulegen, wurde das Präparat in der Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Das Entwinden dauerte eine Stunde und bildete den entscheidenden Unterschied im Vergleich zur neutralen Einzelzellgelelektrophorese. Bei stark basischem pH-Wert oder Temperaturen zwischen 70-90 °C entspiralisiert sich die DNS-Doppelhelix durch Ionisation der Purin- und Pyrimidinbasen bzw. Destabilisierung der Wasserstoffbrückenbindungen zu zwei Einzelsträngen [107]. Durch den hohen pH-Wert (13,2-13,4) relaxierte die DNS. Des weiteren konvertierten Alkali-labile Seiten zu Einzelstrangbrüchen. Anschließend fand die Wanderung im elektrischen Feld von 0,8 V/cm bei 300 mA, 25 V über 30 min statt, wobei Spannung und Stromstärke durch die Elektrophoresepuffermenge eingestellt wurden. Im elektrischen Feld wanderte die degradierte DNS in Abhängigkeit von Bruchstückgröße und Ladung zur positiv geladenen Anode.

2.9 Neutralisation

Die beschichteten Objektträger wurden 24 Stunden in der Neutralisationslösung belassen. Dieses neutrale Milieu war nötig, um die DNS mit Ethidiumbromid anfärben zu können.

2.10 Computergestützte Auswertung nach Fluoreszenzfärbung

2.10.1 Fluoreszenzfärbung

Die Objektträger wurden mit 85 µl der Fluoreszenzfarbstoff-Lösung beschichtet. Ethidiumbromid ist ein interkalierender Farbstoff, der sich zwischen die Basen der DNS lagert und über diesen Mechanismus die DNS um je 0,34 nm verlängert, entsprechend der Länge eines Basenpaares. Nach 8 Minuten wurde dreimal mit Aqua dest. gespült, um Farbstoffkristalle zu entfernen und eine die Messung beeinträchtigende Hintergrundfluoreszenz zu minimieren. Die Präparate wurden in Aqua dest. eingedeckt.

2.10.2 Messung der Kometen

Der DNS-Schaden wurde computergestützt fluoreszenzmikroskopisch gemessen. Dazu wurde über ein Auflichtfluoreszenzmikroskop mit angeschlossener CCD-Kamera die Bildinformation des Präparates in das Analyseprogramm Komet 3.1 übertragen und als Pixelbild am Monitor verfügbar gemacht. Die Wellenlängen des Erregungsfilters betragen 510 - 560 nm, beim Sperrfilter 590 nm. Als Lichtquelle des Fluoreszenzmikroskopes diente eine Quecksilberdampflampe, welche nach ca. 100 Stunden Leuchtzeit ausgewechselt wurde. An den Austausch der Lampe schloß sich die Kalibrierung des Systems mit einem frisch gefertigten Eichansatz des Probanden 1 an (zur Probandencharakteristik siehe Tab. 3).

Die Größe des Meßfensters wurde bezüglich Höhe und Breite der Kometen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis optimiert. Die Mindesthöhe wurde an den Kopfgrößen der Nullproben (größter Kopf) und die Mindestbreite an den Kometen, die mit der höchsten Energiedosis bestrahlt wurden (längster Schweif), eingestellt. Dabei durfte das Meßfenster nicht zu lang sein, weil sonst in Abhängigkeit von der Zellanzahl mehr als ein Komet gleichzeitig gemessen worden wäre. Das Hintergrundfenster wurde so klein wie möglich gehalten, damit benachbarte Kometen nicht als „Grundrauschen“ in die Analyse eingingen. Je Energiedosis wurden 2 Objektträger mit je 25 Zellen ausgewertet, so daß sich die Schadensmessung pro Energiedosis auf insgesamt 50 Zellen bezog.

2.10.3 Meßparameter

Im Comet Assay werden DNS-Diskontinuitäten als Summationsschaden ermittelt [62], das heißt, daß Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche, Alkali-labile Seiten und Basenschäden in unterschiedlichem Verhältnis in die fluoreszenzmikroskopisch gewonnene Schadensbilanz einfließen. Fläche, Umfang und Fluoreszenzintensitäten der Kometen werden direkt gemessen, wobei die Verfahrenswahl (alkalisch, neutral) den hauptsächlich vorhandenen DNS-Schadenstyp bestimmt. Die gebräuchlichsten Parameter der computergestützten bzw. automatischen Bildanalyse werden im Einzelnen kurz dargestellt.

Grundlage der Meßparameter ist die Unterteilung der zellulären DNS in Kopf und Schweif. Der Kopf entspricht der DNS, die sich innerhalb der Kavität befindet, in der die Einzelzelle eingebettet war, also nicht bzw. kaum gewanderter DNS. Im Schweif befindet sich die DNS, die aus der Agarosekavität aufgrund von negativer Ladung und größerer Fragmentierung im elektrischen Feld zur Anode gewandert ist (Abb. 3).

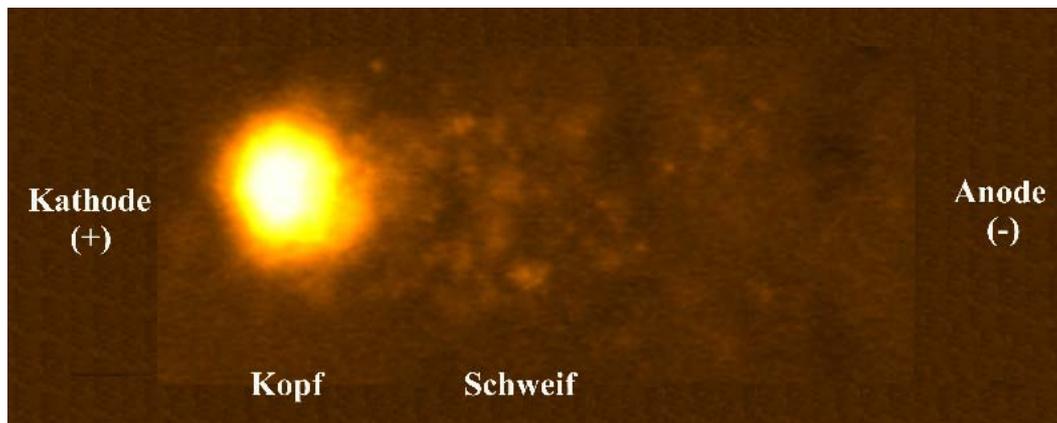


Abb. 3: Kopf und Schweif nach Wanderung im elektrischen Feld

Die Fluoreszenzintensität über der gesamten DNS einer Zelle beträgt 1. Daraus ergibt sich die Berechnung des prozentualen DNS-Gehalts in Kopf und Schweif.

$$\% \text{ DNS im Kopf} = \frac{\text{optische Intensität im Kopf}}{\text{optische Intensität in Kopf und Schweif}} \times 100$$

$$\% \text{ DNS im Schweif} = 1 - \% \text{ DNS im Kopf}$$

Ein weiterer Meßparameter ist die Schweiflänge (tail length) in μm . Je nach Definition [7] werden die Gesamtlänge (Kopf + Schweif), die Länge vom Zentrum des Kopfes ($\frac{1}{2}\text{Kopf} + \text{Schweif}$) oder die Länge der Wanderungstrecke vom Rand des Schweifes (Schweif) als Schweiflänge bezeichnet. Analog dem physikalischen Moment läßt sich ein Kometenmoment (tail moment) aus dem Produkt von Schweiflänge und % DNS im Schweif (% tail DNA), das ebenfalls zur DNS-Schadensbestimmung verwendet wird, berechnen. In der vorliegenden Arbeit wurden vorrangig % DNS im Schweif und in wenigen Experimenten die Schweiflänge (Schweif) in μm zur Schadensbestimmung verwendet.

Neben den geometrischen werden zeitliche Schadensfestlegungen unterschieden: Der **DNS-Basalschaden** liegt zum Zeitpunkt t_0 vor, wenn noch kein zusätzliches Schadensereignis (Bestrahlung) eingetreten ist. Unter **Initialschaden** versteht man den Schaden sofort nach dem Einwirken einer Noxe, der nach stattgefundener Reparatur als **Residualschaden** verbleibt (Abb. 4 und 5). Der prozentuale Residualschaden zum Reparaturzeitpunkt t_x nach applizierter Energiedosis D berechnet sich in Anlehnung an Alapetite et. al. [3].

$$\text{Residualschaden [\%]} (t_x, D) = \frac{\% \text{ DNS im Schweif } (t_x, D) - \text{Basalschaden}}{\text{Initialschaden} - \text{Basalschaden}} \times 100$$

Die **Reparaturkapazität** gibt das Vermögen zur Verminderung des Initialschadens in einem definiertem Zeitraum an.

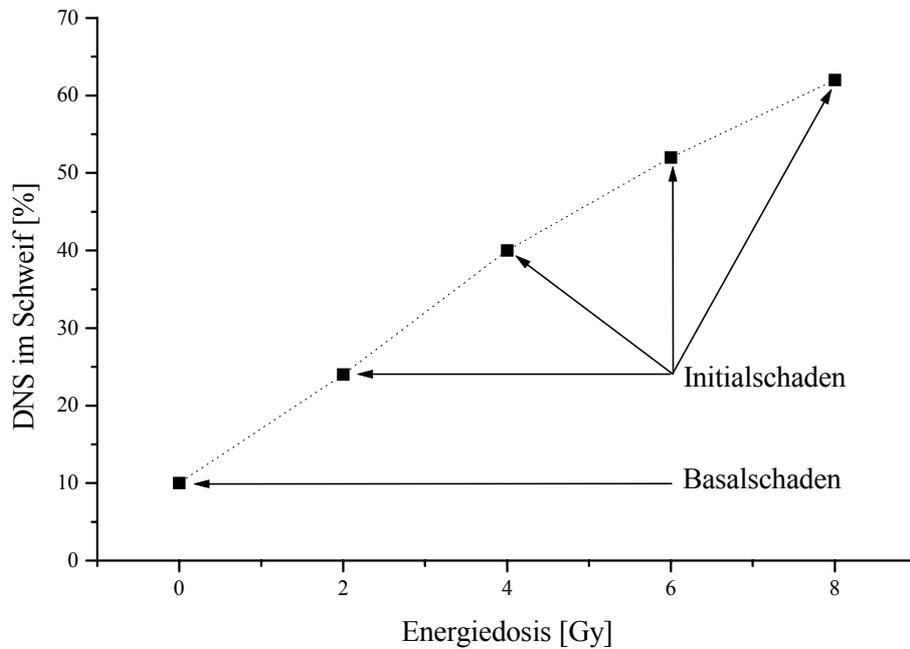


Abb. 4: Darstellung einer repräsentativen Energiedosiswirkungskurve zur Definition von Basalschaden und Initialschaden; Schädigungsparameter war DNS im Schweif [%].

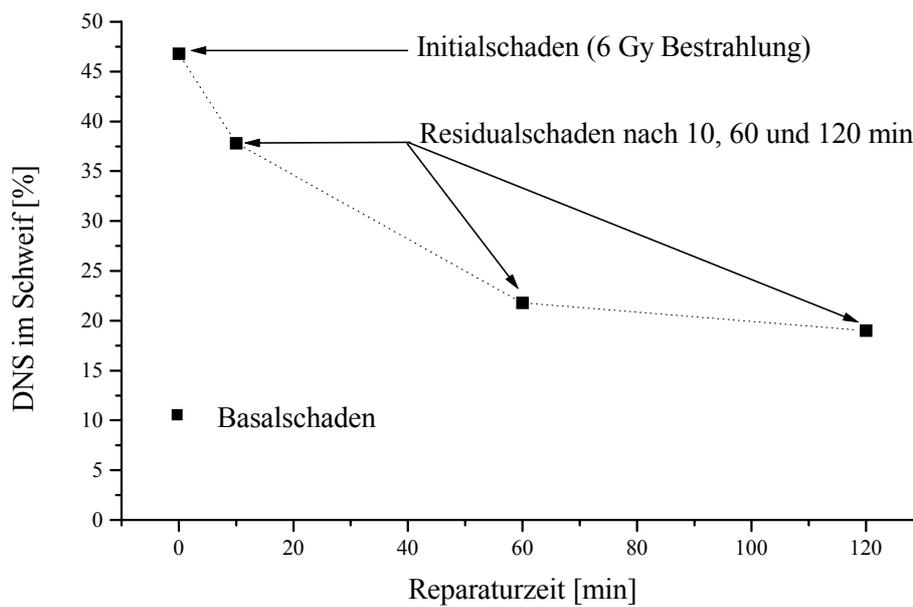


Abb. 5: Darstellung einer repräsentativen Reparaturkinetik zur Definition des Residualschadens nach Bestrahlung mit 6 Gy in Abhängigkeit von der Reparaturzeit; Schädigungsparameter war DNS im Schweif [%]. Der Basalschaden wurde zur Visualisierung der Größenrelationen mit dargestellt.

2.11 Patienten- und Probandencharakteristik

2.11.1 Probandengruppe

Als Probanden wurden 11 freiwillige Spender im Alter von 22-59 Jahren ausgewählt und mehrfach mit dem Comet Assay untersucht. Es wurde jeweils ein Blutbild erstellt und das Untersuchungsmaterial (Blutzellen) in Zitrat ungerinnbar gewonnen. Die Probanden mußten als Normalpersonen folgende Bedingungen erfüllen: Guter Allgemein- und Ernährungszustand, keine aktuelle Krankheit, keine Medikamenteneinnahme in der letzten Woche, keine extreme körperliche Aktivität einen Tag vor dem Comet Assay, Blutbildparameter im Normbereich und nach Möglichkeit Nichtraucher.

Die Probandencharakteristika sind in Tab. 3 aufgeführt. Bei Altersangaben, die als Zeitspanne aufgeführt sind, wurden die Probanden über einen größeren Lebenszeitraum mehrfach mit dem Comet Assay untersucht.

Tab. 3: Probandencharakteristika

Nummer	Geschlecht	Alter	Raucher
1	männlich	22-26	nein
2	weiblich	23	nein
3	weiblich	48	nein
4	männlich	25	nein
5	männlich	23	nein
6	männlich	28	nein
7	weiblich	42	ja
8	männlich	25	nein
9	weiblich	26-28	nein
10	männlich	24-25	ja
11	weiblich	59	nein

2.11.2 Patientengruppe

Im Rahmen einer von September 1997 bis Oktober 1998 bei Patienten mit Rektumkarzinom und postoperativer Radiochemotherapie durchgeführten klinischen Phase-II-Studie wurde der Radioprotektor Amifostin in der ersten und fünften Radiotherapiewoche parallel zur Chemotherapie mit 5-Fluoruracil eingesetzt [30]. Am ersten Behandlungstag wurden von 6 Patienten Blutproben vor und nach Applikation von 500 mg Amifostin gewonnen und mit dem Comet Assay untersucht (Paarvergleich). Die Patienten waren bis zu diesem Zeitpunkt weder zytostatisch noch radiotherapeutisch vorbehandelt. Die entsprechenden Patientencharakteristika sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Charakteristika der Patienten mit Rektumkarzinom der klinischen Phase-II-Studie zum intermittierenden Gebrauch von 500 mg Amifostin während der postoperativen Radiochemotherapie (1. und 5. Therapiewoche, parallel zur Chemotherapie), Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis Seite III-IV.

Nummer	Alter	Geschlecht	pT	pN	M	G	R	St.	OP
1	70	männlich	3	1	0	2	0	III	APR
2	56	männlich	3	0	0	2	0	II	APR
3	61	männlich	3	0	0	2	0	II	APR
4	55	männlich	3	0	0	2	0	II	APR
5	57	männlich	3	0	0	2	0	II	APR
6	56	weiblich	2	1	0	2	0	III	TAR

Eine Kontrollgruppe der Studie wurde nicht untersucht, da mit der Blutentnahme vor und nach der Amifostingabe eine intraindividuelle Kontrolle bestand.

2.12 Statistische Auswertung

Die Berechnungen und Verfahrensauswahl wurden vom Institut für Biomathematik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durch Frau Dr. Lautenschläger beratend betreut. Den Berechnungen lag die Anzahl von mindestens 50 Zellen (pro Energiedosis oder Reparaturzeit) zugrunde. Aus dem allgemeinen linearen Modell (ALM) wurde der Test für Meßwiederholungen verwendet. Der t-Test und die Varianzanalyse sind als Spezialfälle der linearen Modelle implementiert [90]. Die Testung eines Einflusses an dem gleichen Probanden wurde mit dem gepaarten T-Test durchgeführt. Bei der Verwendung von Boxplots entsprach der Median der Linie im Zentrum der Box, die Boxgrenzen dem unteren (25%) und oberen (75%) Quartil der Werte. Die Spanne der Einzelwerte wurde beiderseits nach außen als „whisker“ aufgetragen und hatte maximal jeweils die Länge des anderthalbfachen der Länge der Box. Werte außerhalb dieses Bereiches (Hälftespielraum) wurden durch einen Kreis (mit Angabe der Nummer des gemessenen Kometen) als Einzelbeobachtung besonders gekennzeichnet [1].

3

Ergebnisse

3.1 Evaluierung des Comet Assays

Der Comet Assay findet in vielen Modifikationen Anwendung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die alkalische Version der Einzelzellelektrophorese verwendet. Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Versuchsdurchführung wurde eine Serie von Untersuchungen unter vergleichbaren Bedingungen hinsichtlich Präparation, Bestrahlung, Lyse und der weiteren Arbeitsschritte bis zur Auswertung mit von einem Spender stammenden Blutzellen durchgeführt. Dadurch sollten insbesondere mögliche subjektiv bedingte zeitliche Einflüsse als auch geräteseitige Einflüsse auf die Untersuchungsergebnisse ermittelt werden. Die Teilergebnisse der Experimente wurden grau unterlegt gekennzeichnet.

3.1.1 Reproduzierbarkeit bei gleichartig erstellten Präparaten

Um die Reproduzierbarkeit der Messungen innerhalb eines Experiments zu bestimmen, wurden 21 auf gleiche Weise beschichtete Präparate (PBS-Agarose) erstellt. Von Proband 1 wurden Blutzellen in Sandwichlayertechnik präpariert, mit 2 Gy bestrahlt und gemäß des Protokolls fertiggestellt und ausgewertet. Pro Präparat wurden 50 Kometen gemessen (Abb. 6).

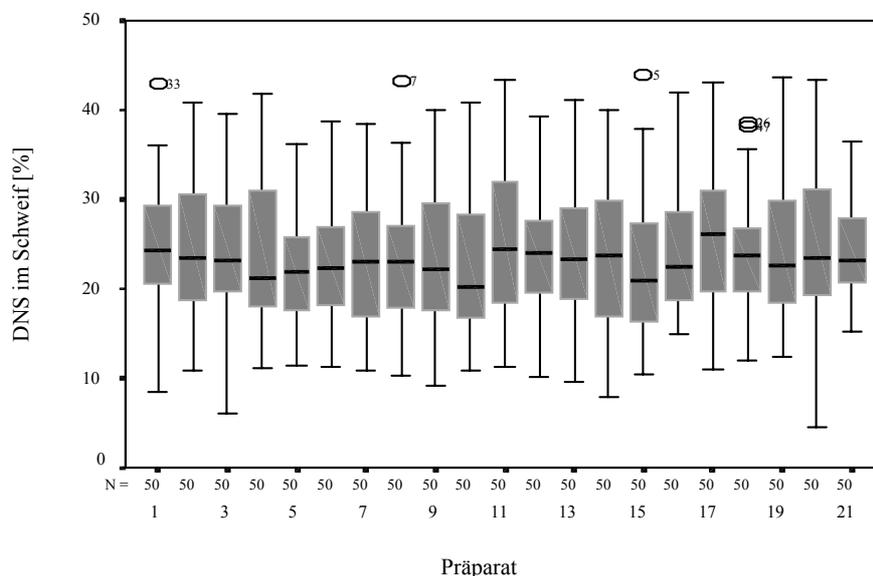


Abb. 6: Darstellung von 21 Präparaten mit je 50 Einzelwerten als Boxplot (Nomenklatur siehe 2.12) nach Bestrahlung mit 2 Gy ohne Reparatur; Schädigungsparameter war DNS im Schweif [%]. Allgemeines lineares Modell: Kein signifikanter Unterschied war zwischen den Präparaten feststellbar mit $p=0,743$.

Systematische Fehler, insbesondere beim zeitlichen Ablauf, sollten als Summationseffekt abgeschätzt werden. Da die 21 Objektträger nacheinander beschichtet, in Sixwells, Küvetten und Elektrophoresekammer gegeben wurden, resultierte ein im Sekundenbereich liegender Unterschied bei der Überführung in andere Lösungen und Medien, dessen Einfluß bezüglich einer längeren Wirkungszeit der Substanzen auf die Präparate überprüft werden sollte. Weitere Faktoren, die mit diesem Versuch gleichzeitig in ihrer Relevanz getestet wurden, waren Feldschwankungen innerhalb der Elektrophoresekammer und Fluoreszenzabnahme während der computergestützten Auswertung.

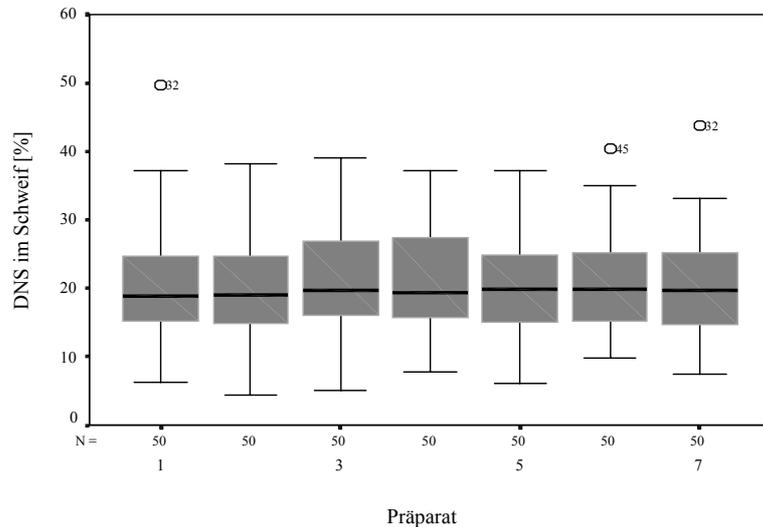
Die Bewertung der für die 21 Präparate ermittelten Versuchsergebnisse mit dem Test für Meßwiederholungen des allgemeinen linearen Modells (ALM) ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,743$). Die Präparate wiesen vergleichbare DNS-Schädigungen auf. Damit konnte gezeigt werden, daß mit der genutzten Versuchsdurchführung die beschriebenen systematischen Fehlerquellen keinen signifikanten Einfluß auf die Ergebnisse der Messungen hatten.

3.1.2 Reproduzierbarkeit der Reparatur nach Bestrahlung

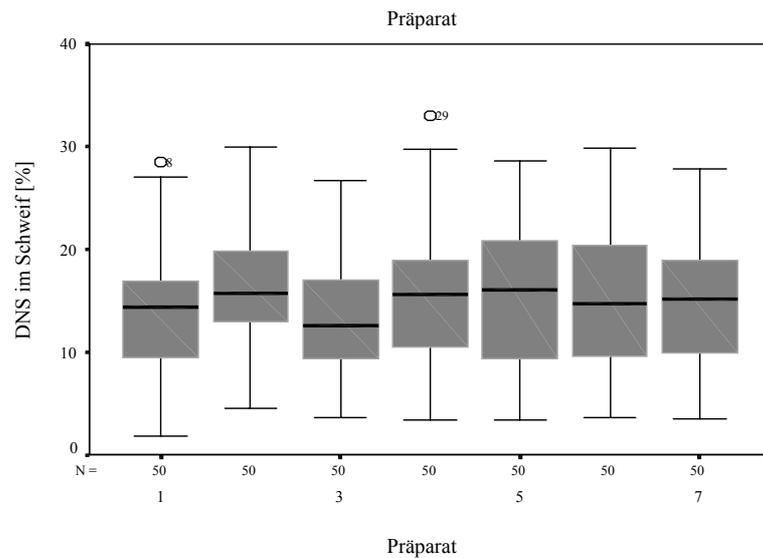
Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit von Reparaturvorgängen in Abhängigkeit von der Reparaturzeit wurden in einem zweiten Experiment 21 Objektträger mit Blutzellen von Proband 1 in Sandwichlayertechnik mit RPMI-Agarose präpariert, mit 2 Gy bestrahlt und jeweils 7 Objektträger nach 0 und 10 Minuten sowie 5 Objektträger nach 60 Minuten Reparatur untersucht (2 Objektträger dienten als Nullprobe zur Eichung).

Die statistische Auswertung der Meßergebnisse mit dem ALM zeigte keinen signifikanten Unterschied innerhalb einer Reparaturgruppe (0 min, $p=0,906$; 10 min, $p=0,206$; 60 min, $p=0,529$; Abb. 7 a-c), so daß die genannten äußeren Einflüsse vernachlässigt werden können. Zwischen den drei Reparaturgruppen war der Unterschied der Schädigungen jeweils mit $p<0,01$ statistisch signifikant, so daß eine Schadensabnahme durch Reparatur nach 10 und 60 min meßbar war.

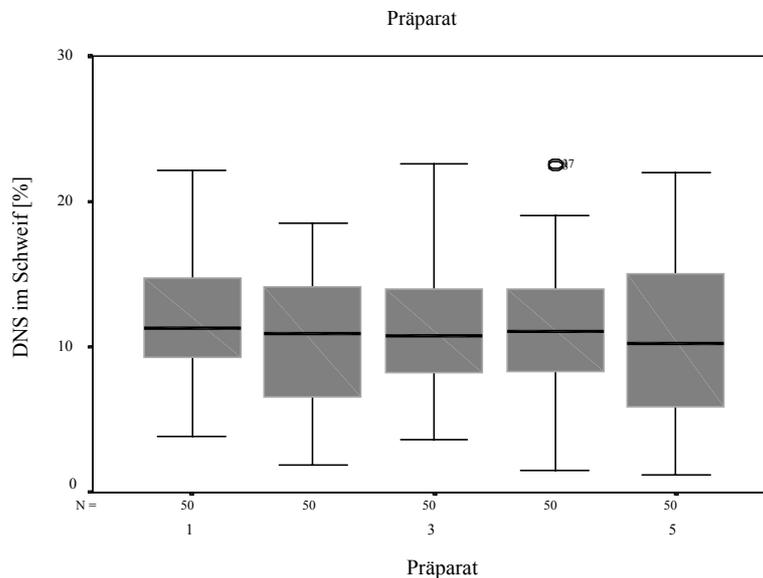
a)



b)



c)



10

Abb. 7 a-c: Darstellung von Präparaten mit je 50 Einzelwerten als Boxplot (Nomenklatur siehe 2.12) nach Bestrahlung mit 2 Gy bei a) 0 min Reparatur, $p=0,906$, b) 10 min Reparatur, $p=0,206$, c) 60 min Reparatur, $p=0,529$; Schädigungsparameter war DNS im Schwef [%]. ALM: Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen den drei Reparaturniveaus ($p<0,01$), aber nicht innerhalb einer Reparaturgruppe.

3.1.3 Reproduzierbarkeit zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Nach der Prüfung der Schwankungsbreite innerhalb eines Experiments sollte die Streuung zwischen mehreren Versuchen zu verschiedenen Zeitpunkten an Zellen desselben Probanden unter gleichen experimentellen Bedingungen untersucht werden. Neben systematischen Einflüssen auf den Assay könnten Umweltfaktoren, die auf die Probanden einwirken, die Strahlensensibilität im Zeitverlauf beeinflussen. Bei der Breite der äußeren Einflüsse auf die Probanden (Ernährung, Streß, körperliche Aktivität, Änderung des Gesundheitsstatus) wären die Effekte nur in Summation abschätzbar.

Den Erfahrungen des Labors folgend wurden zunächst Energiedosiswirkungskurven unter Verwendung von PBS-Agarose erstellt. Für Reparaturuntersuchungen bot der Einsatz von RPMI-Agarose Vorteile. Der Vergleich der Strahlensensibilität zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde für PBS- und RPMI-Agarosen separat geführt, da unterschiedliche Geleigenschaften zu unterschiedlichem Wanderungsverhalten der DNS im Gel während der Elektrophorese führten (siehe 3.1.5). In diese Auswertung wurden auch experimentelle Daten der in-vitro-Untersuchungen von Amifostin (Kontrollgruppe ohne Amifostin) einbezogen, wodurch sich die Energiedosisauswahl begründet. Für **PBS-Agarosen** wurden Energiedosiswirkungsbeziehungen von zwei Probanden zu jeweils zwei Zeitpunkten (t_1 , t_2) an Blutzellen untersucht (Tab. 5).

Tab. 5: Prozentuale Verteilung der kernhaltigen Blutzellen bei Proband 1 und 5 zu jeweils zwei unterschiedlichen Zeitpunkten der Comet-Assay-Experimente

Proband	1			5		
	t_1	16 Wochen	t_2	t_1	4 Wochen	t_2
Lymphozyten [%]	35,4		32,1	36,8		35,8
Monozyten [%]	10,4		8,9	11,8		11,3
Granulozyten [%]	54,2		58,9	52,6		52,8

Zu den zwei Zeitpunkten schwankte bei Proband 1 die Blutzellverteilung stärker als bei Proband 5, wobei auch der zeitliche Abstand der Experimente bei Proband 1 größer war.

Zwischen den beiden Zeitpunkten bestand bei den Probanden kein signifikanter Unterschied für die Energiedosen 0, 0,7 und 2 Gy. Für die in dieser Serie größte getestete Energiedosis (4 Gy, Proband 1) war der Unterschied mit dem gepaarten T-Test signifikant (Tab. 6).

Tab. 6: Gepaarter T-Test der Energiedosiswirkungsbeziehungen der Blutzellen von Proband 1 und 5 (Tab. 5) zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (t_1 , t_2), Standardabweichung (SD), Prüfgröße (T), Freiheitsgrad (df). Zeitunterschied der Experimente: 16 Wochen (Proband 1), 4 Wochen (Proband 5); Schädigungsparameter war DNS im Schweif [%].

Proband	Energiedosis [Gy]	DNS im Schweif [%]		Gepaarte Differenzen		T	df	Signifikanz (zweiseitig)
		t_1	t_2	Mittelwert	SD			
1	0	11,1	12,4	-1,3	10,17	-0,95	49	0,347
1	2	26,6	26,4	0,2	8,95	0,18	49	0,855
1	4	43,3	40,1	3,2	9,77	2,31	49	0,025
5	0	13,3	12,1	1,2	6,81	1,30	49	0,200
5	0,7	22,8	20,9	1,9	8,45	1,65	49	0,105
5	2	33,1	33,5	-0,4	8,19	-0,40	49	0,692

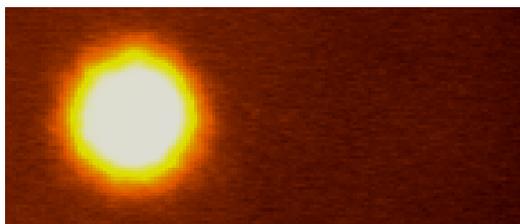
Für **RPMI-Agarosen** wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen an separierten Lymphozyten der Probanden 1 und 9 analog mit dem gepaarten T-Test verglichen (Tab. 7).

Tab. 7: Gepaarter T-Test der Dosiswirkungsbeziehungen zu 2 verschiedenen Zeitpunkten (t_1 , t_2) für Proband 1 und 9 bei isolierten Lymphozyten, Standardabweichung (SD), Prüfgröße (T), Freiheitsgrad (df). Zeitunterschied der Experimente: 3 Tage (Proband 1), 2 Tage (Proband 9); Schädigungsparameter war DNS im Schweif [%].

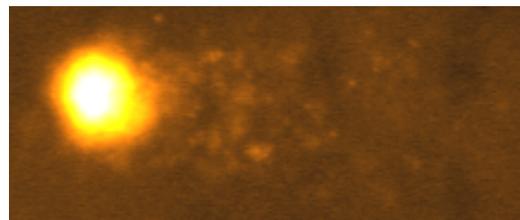
Proband	Energiedosis [Gy]	DNS im Schweif [%]		Gepaarte Differenzen		T	df	Signifikanz (zweiseitig)
		t_1	t_2	Mittelwert	SD			
1	0	10,9	10,8	0,1	6,54	0,20	49	0,843
1	4	39,1	36,0	3,1	11,99	1,84	49	0,071
1	8	56,6	54,6	2,0	16,44	0,86	49	0,391
9	0	9,6	11,2	-1,6	8,41	-1,39	49	0,171
9	6	45,7	44,1	1,6	13,07	0,89	49	0,378

Bei Experimenten mit RPMI-Agarosen an isolierten Lymphozyten bestand kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen den - um wenige Tage versetzt - erstellten Energiedosiswirkungskurven desselben Probanden.

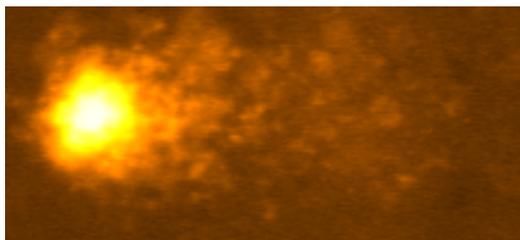
Neben den quantitativen Schädigungsparametern, die unter 2.10.3 beschrieben wurden, gab es zu Beginn der Comet-Assay-Forschung noch nicht die Möglichkeit der computergestützten Auswertung. Es war ein qualitativer Score mit 4 Schweregraden zur Determinierung der Schädigung in Gebrauch [34]. Da für beide Auswertungsarten - quantitativ (% DNS im Schweif) und qualitativ (Score) - die fluoreszenzmikroskopisch sichtbare Kometenformation die Informationsquelle bildete, wurden repräsentative Pixelbilder einer Energiedosiswirkungsuntersuchung mit RPMI-Agarose von Proband 1 dargestellt (Abb. 8), um die optische Schadensentwicklung zu visualisieren.



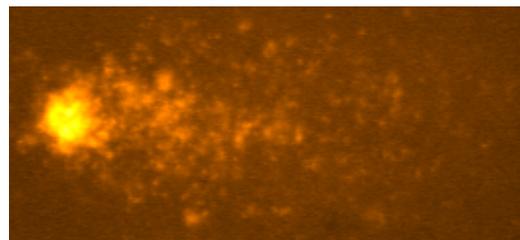
0 Gy (8% DNS im Schweif)



2 Gy (21% DNS im Schweif)



4 Gy (42% DNS im Schweif)



8 Gy (59% DNS im Schweif)

Abb. 8: Darstellung der Kometenstrukturen von Proband 1 bei zunehmenden Energiedosen von 0 bis 8 Gy. Die Präparate waren mit RPMI-Agarose beschichtet; Schädigungsparameter war DNS im Schweif [%].

Aus den Kometenabbildungen war eine Schadenszunahme mit steigender Energiedosis an der zunehmenden Schweifintensität und Schweiflänge (bis 4 Gy) sowie an der Abnahme der Kopfgröße erkennbar. Am fluoreszenzmikroskopischen Bild konnte als Ausgangspunkt der Berechnung der Meßparameter (2.10.3) somit auch die optische Schadenszunahme unter Bestrahlung exemplarisch verdeutlicht werden.

Es sollte überprüft werden, welchen Effekt die Lösungsmittel (PBS und RPMI) der Agarose auf die prozentuale DNS-Schadensmessung im Schweif haben. Entsprechend wurden Energiedosiswirkungskurven (0 bis 8 Gy) bei Proband 1 mit beiden Lösungsmitteln erstellt. Die Basal- und Initialschäden wurden in Abb. 9, der gepaarte T-Test zur Prüfung der Signifikanz von Unterschieden in Tab. 8 aufgetragen.

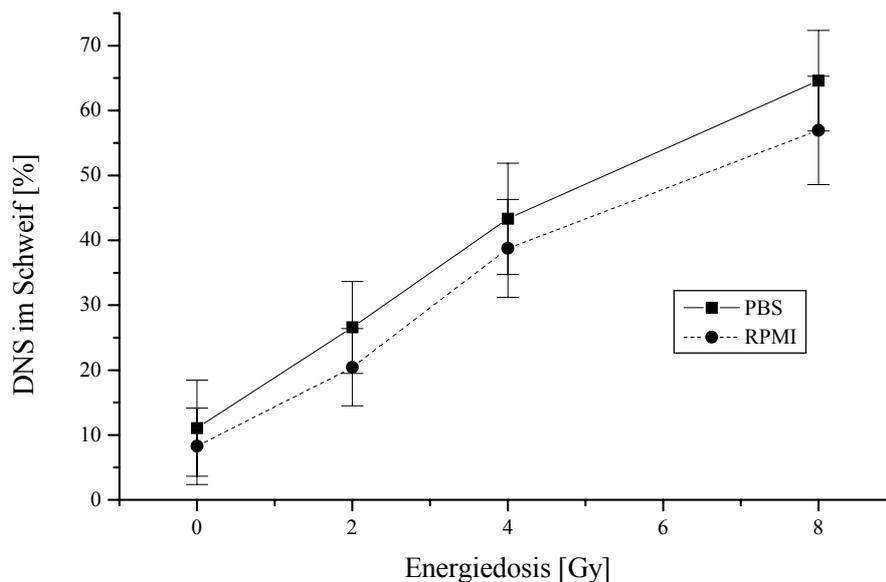


Abb. 9: Energiedosiswirkungskurven mit PBS-Agarose und RPMI-Agarose. Die Blutzellen stammten von Proband 1; Schädigungsparameter war DNS im Schweif [%]. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung (n=50).

Tab. 8: Gepaarter T-Test der Energiedosiswirkungsbeziehungen mit PBS-Agarose und RPMI-Agarose. Die Blutzellen stammten von Proband 1; Schädigungsparameter war DNS im Schweif [%]. Standardabweichung (SD), Prüfgröße (T), Freiheitsgrad (df).

Energie-dosis [Gy]	DNS im Schweif [%]		Gepaarte Differenzen		T	df	Signifikanz (zweiseitig)
	RPMI-Agarose	PBS-Agarose	Mittelwert	SD			
0	8,3	11,1	-2,8	9,83	-2,01	49	0,049
2	20,4	26,6	-6,2	8,19	-5,31	49	0,000
4	38,8	43,3	-4,5	10,56	-3,05	49	0,004
8	56,9	64,6	-7,7	11,46	-4,73	49	0,000

Aus den Energiedosiswirkungskurven war ein signifikant erhöhter Basal- und Initialschaden mit $p < 0,05$ bei Verwendung von PBS ersichtlich.

Zur Untersuchung des Einflusses der Agaroselösungsmittel auf die Wanderungstrecke der DNS wurden für das gleiche Experiment die Schweiflängen in μm mit dem gepaarten T-Test geprüft.

Tab. 9: Gepaarter T-Test der Energiedosiswirkungsbeziehungen mit zwei verschiedenen Agaroselösungsmitteln bei Blutzellen von Proband 1. Standardabweichung (SD), Prüfgröße (T), Freiheitsgrad (df); Schädigungsparameter Schweiflänge [μm].

Energie-dosis [Gy]	Schweiflänge [μm]		Gepaarte Differenzen		T	df	Signifikanz (zweiseitig)
	RPMI-Agarose	PBS-Agarose	Mittelwert	SD			
0	56,5	38,2	18,3	56,08	2,31	49	0,025
2	121,5	98,2	23,3	58,41	2,82	49	0,007
4	142,4	121,3	21,1	41,50	3,60	49	0,001
8	147,6	149,3	-1,7	43,73	-0,28	49	0,780

Mit PBS-Agarose waren die Schweife im Bereich unter 8 Gy signifikant kürzer (Tab. 9) aber intensiver fluoreszierend (größere Schädigung gemessen in % DNS im Schweif, Tab. 8) als mit RPMI-Agarose.

3.1.6 Radiosensitivität bei isolierten Lymphozyten und dem Gesamtblut

Es sollte evaluiert werden, ob die separierten Lymphozyten im Comet Assay dieselbe Radiosensitivität wie alle kernhaltigen Komponenten des Blutes (Leukozyten) aufwiesen. Die Versuche wurden mit RPMI-Agarose durchgeführt, um neben Basal- und Initialschäden (Abb. 10) auch die Reparaturkinetik über 60 Minuten mit den entsprechenden Residualschäden (Abb. 11) auszuwerten. In Tab. 10 ist der gepaarte T-Test der Ergebnisse der Energiedosiswirkungskurve und der Reparaturkinetik zusammengefasst. Daraus gingen folgende Zwischenergebnisse hervor:

- Der Basalschaden der Lymphozyten war mit $p < 0,05$ signifikant größer als bei allen Blutzellen. Diese erhöhte Schaden blieb auch nach 10 und 60 min Reparatur bestehen.
- Die Initialschäden nach 2, 4 und 8 Gy unterschieden sich mit $p > 0,05$ nicht signifikant.
- Abgesehen von einem Präparat (8 Gy, 10 min) waren die Residualschäden aller kernhaltigen Zellen des Blutes signifikant geringer als bei isolierten Lymphozyten.

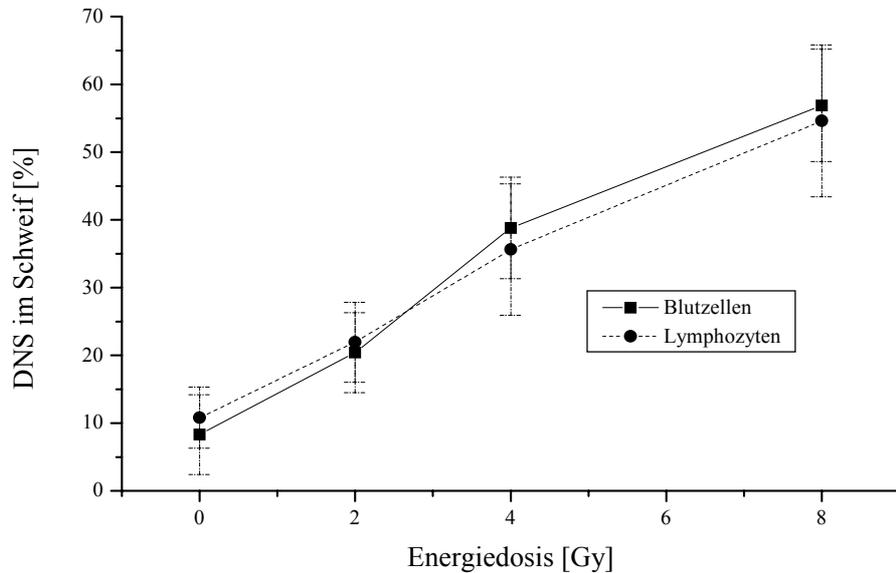


Abb. 10: Es wurden die Energiedosiswirkungskurven - Basalschaden (0 Gy), Initialschäden (2 - 8 Gy) - für isolierte Lymphozyten und Gesamtblut aufgetragen; Schädigungsparameter war DNS im Schweiß [%]. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen (n=50).

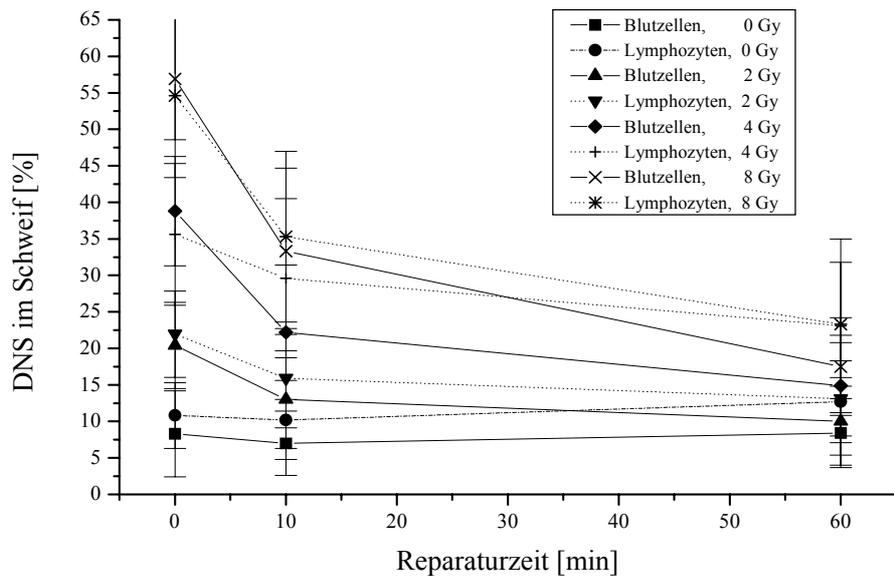


Abb. 11: Reparaturkinetik der Energiedosiswirkungskurve von Blutzellen und isolierten Lymphozyten; Schädigungsparameter war DNS im Schweiß [%]. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen (n=50).

Tab. 10: Gepaarter T-Test der Energiedosiswirkungsbeziehungen (Abb. 10) und Reparatur (Abb. 11) bei allen kernhaltigen Blutzellen im Vergleich zu isolierten Lymphozyten. Spender war Proband 1. Prüfgröße (T), Freiheitsgrad (df); Schädigungsparameter war DNS im Schweif [%].

Energiedosis [Gy]	Reparaturzeit [min]	T	df	Signifikanz (2-seitig)
0	0	-2,75	49	0,008
2	0	-1,27	49	0,209
4	0	1,90	49	0,064
8	0	1,09	49	0,283
0	10	-3,12	49	0,003
2	10	-2,05	49	0,046
4	10	-4,07	49	0,000
8	10	-0,95	49	0,347
0	60	-4,58	49	0,000
2	60	-2,23	49	0,031
4	60	-3,87	49	0,000
8	60	-3,72	49	0,001

3.2 Amifostin in vitro

3.2.1 Wirkung des Prodrugs Amifostin bei kernhaltigen Blutzellen

Bei 11 Probanden wurde das abgenommene Zitratblut mit Amifostinkonzentrationen von 0 bis 1000 µg/ml in vitro versetzt. Danach erfolgte die Bestrahlung mit Energiedosen von 0,7 bzw. 2 Gy. Die Wahl der Energiedosen leitete sich aus den Erfahrungen ab, die im Labor an Normalpersonen [57] gewonnen wurden (gute Abgrenzbarkeit von Kopf und Schweiß, geringe Standardabweichung der Verteilung von 50 Kometen einer Energiedosis). Außerdem entsprechen 2 Gy einer konventionellen Einzeldosis während einer Strahlentherapie.

Bei Proband 1 und 5 wurden jeweils zwei Experimente durchgeführt. Sie sind mit Letter a und b bezeichnet. Um die Isoosmolarität zu wahren, wurde Amifostin in 0,9-prozentiger isotoner Natriumchloridlösung gelöst und den Blutzellen zugegeben. Anschließend erfolgte die Präparation wie unter 2.4 beschrieben mit PBS-Agarose.

Zur Einschätzung der Wirkung von Amifostin wurde der (Energie-)Dosis modifizierende Faktor (DMF) eingeführt.

$$\text{DMF} = \frac{\text{DNS im Schweiß [\%] mit Amifostin}}{\text{DNS im Schweiß [\%] ohne Amifostin}}$$

Definitionsgemäß entspricht ein $\text{DMF} > 1$ einer Radiosensibilisierung und ein $\text{DMF} < 1$ einer Radioprotektion. Bei einem $\text{DMF} = 1$ wird die Wirkung der Bestrahlung nicht modifiziert. Der DMF wurde verwendet, um alle Probanden beginnend bei einem Ausgangsniveau ($\text{DMF} = 1$ bei Bestrahlung ohne Amifostin) miteinander vergleichen zu können.

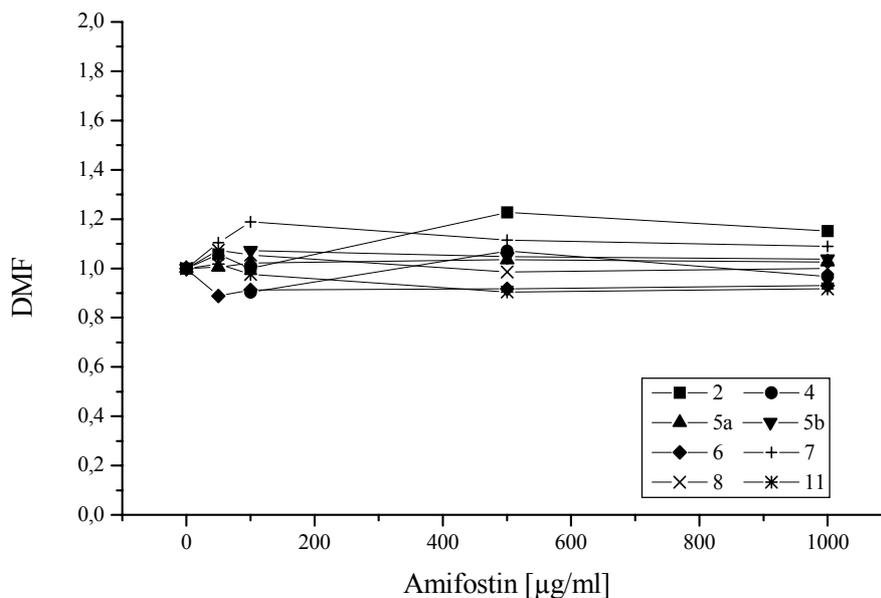


Abb. 12: Darstellung der DMF (n=50) der Probanden (Tab. 3) bei Amifostinkonzentrationen von 0 bis 1000 µg/ml nach Bestrahlung mit 0,7 Gy.

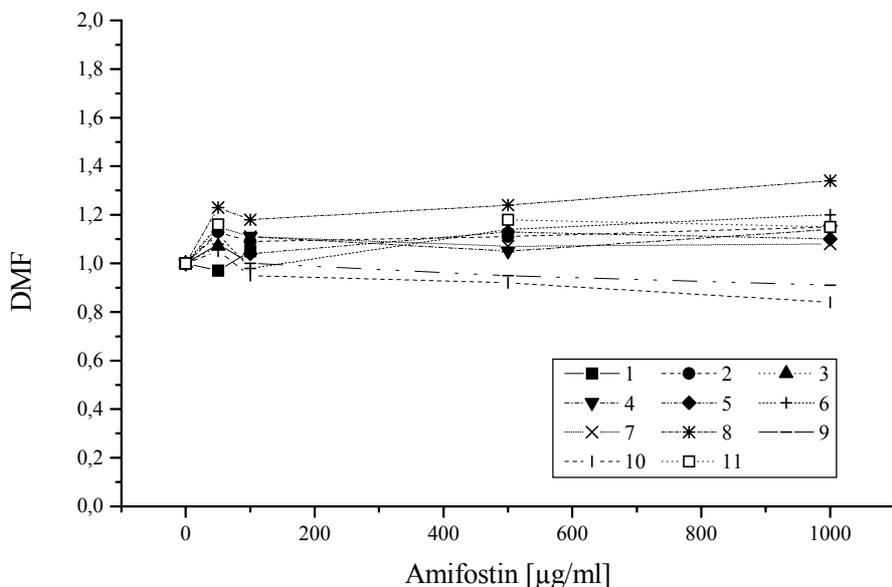


Abb. 13: Darstellung der DMF (n=50) der Probanden (Tab. 3) bei den Amifostinkonzentrationen von 0 bis 1000 µg/ml nach Bestrahlung mit 2 Gy.

Tab.11.: DMF (n=50) der Probanden (Tab. 3) bei den Amifostinkonzentrationen von 0 bis 1000 µg/ml nach Bestrahlung mit 0,7 bzw. 2 Gy.

Amifostinkonzentration [µg/ml]	DMF bei Energiedosis von	
	0,7 Gy	2 Gy
0	1	1
50	1,02	1,11
100	1,02	1,03
500	1,02	1,05
1000	1,04	1,1
Mittelwert der DMF bei allen Amifostindosen	1,02	1,06
Anzahl der Experimente (Probanden) pro Energiedosis	8 (7)	11 (11)

Die durchschnittlichen DMF bei 0,7 und 2 Gy wiesen bei den verwendeten Amifostinkonzentrationen einen Wert >1 auf (Tab. 11): Bei dem gewählten Versuchsaufbau konnte also kein Effekt bei In-vitro-Applikation von Amifostin an Blutzellen von Normalpersonen nachgewiesen werden.

Als Ursache für die fehlende Radioprotektion wird die Verwendung von Zitratblut angesehen. Zitrat hemmt die alkalische Phosphatase [108], welche zur Aktivierung von Amifostin (Dephosphorylierung zu WR-2711) notwendig ist.

Im Comet Assay ist für das Prodrug Amifostin selbst keine Radioprotektion nachweisbar. Der gemittelte DMF für Amifostin betrug 1,02 bei 0,7 Gy und 1,06 bei 2 Gy.

Aus den unter 3.2.1 beschriebenen Resultaten, ergaben sich folgende Modifizierungen für weitere Versuche mit Amifostin, um den DMF der Wirkform WR-2711 zu determinieren:

Da auf die Verwendung von Zitratblut beim Comet Assay nicht verzichtet werden konnte (avitale Zellen nach Gerinnung), mußte Amifostin schon vor der Zugabe zu Zitratblut oder Zellen, die aus Zitratblut extrahiert wurden, mit alkalischer Phosphatase aktiviert werden.

Effekte, welche die Strahlensensibilität verändern, sind am ehesten an den radiosensitivsten Zellen detektierbar. Deshalb wurden die weiteren Messungen an täglich frisch isolierten Lymphozyten (siehe 2.2.2) zweier Probanden (1 und 9) durchgeführt. So konnten auch Vermengungen von Effekten durch verschiedene Zelltypen (Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten) mit unterschiedlicher Radiosensibilität minimiert werden.

Nach der Gewinnung der frisch isolierten Lymphozyten wurde Amifostin in 0,9-%iger Natriumchloridlösung aufgelöst, bei 37 °C für 15 min mit alkalischer Phosphatase inkubiert und der Zellsuspension zugegeben. Nach erneuter 15-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde der Comet Assay wie unter 2.4-2.10 beschrieben durchgeführt. Um gleiche Bedingungen bei allen Lymphozyten zu erhalten, sind die Zellen, die nicht mit Amifostin und alkalischer Phosphatase behandelt wurden, mit dem Lösungsmittel 0,9 % NaCl in selbiger Weise inkubiert worden. Variablen waren die Energiedosis, die Amifostinkonzentration, die Konzentration alkalischer Phosphatase und die Reparaturzeit.

1. Wirkungsbereich der alkalischen Phosphatase

Um ein Konzentrationsoptimum des Enzyms bei in-vitro-Bedingungen zu definieren, wurden in 0,9-%iger NaCl-Lösung 12 Konzentrationen im Bereich von 0,02-100 U/ml alkalische Phosphatase und 100 µg/ml Amifostin bei 15 min und 37 °C inkubiert und zu den Lymphozyten im Verhältnis 1:1 gegeben (weitere 15 min Inkubation bei 37 °C), so daß eine Endkonzentrationen von 50 µg/ml Amifostin und alkalischer Phosphatase (0,01-50 U/ml) resultierte (Abb.14). Des weiteren wurde eine Probe mit Amifostin ohne alkalische Phosphatase erstellt (Nullprobe V0). Die frisch isolierten Lymphozyten stammten von Proband 9. Nach Durchführung der unter 2.4 geschilderten Präparationsschritte wurde mit einer Energiedosis von 6 Gy bestrahlt.

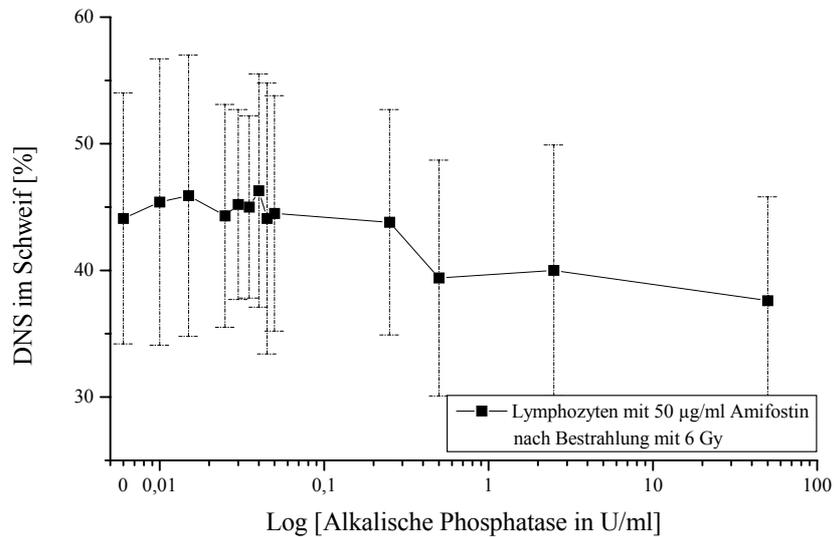


Abb.14: Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Endkonzentration von alkalischer Phosphatase und der Schädigung der DNS im Schweiß [%] bei Lymphozyten nach Inkubation mit 50 µg/ml Amifostin und Bestrahlung mit 6 Gy. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen (n=50).

Aus dem Diagramm ist eine Radioprotektion der Lymphozyten durch aktiviertes Amifostin von einer in-vitro-Endkonzentration (nach Zugabe zu den Lymphozyten) ab 0,5 U/ml alkalischer Phosphatase ersichtlich.

Tab.12: Angabe der Signifikanzen (zweiseitig) des gepaarten T-Tests für die Wirksamkeit von 50 µg/ml Amifostin anhand einer Verdünnungsreihe V0 bis V12 von alkalischer Phosphatase nach Bestrahlung mit 6 Gy bei Lymphozyten (n=50); Schädigungsparameter war DNS im Schweiß [%].

AP [U/ml]		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V0
50	V1		0,200	0,349	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
2,5	V2	0,200		0,743	0,052	0,043	0,020	0,001	0,005	0,001	0,039	0,010	0,021	0,049
0,5	V3	0,349	0,743		0,021	0,006	0,024	0,001	0,003	0,001	0,010	0,004	0,005	0,026
0,25	V4	0,001	0,052	0,021		0,705	0,879	0,173	0,422	0,414	0,799	0,336	0,441	0,897
0,05	V5	0,000	0,043	0,006	0,705		0,865	0,313	0,769	0,697	0,909	0,550	0,687	0,822
0,045	V6	0,000	0,020	0,024	0,879	0,865		0,264	0,598	0,556	0,950	0,448	0,586	0,976
0,04	V7	0,000	0,001	0,001	0,173	0,313	0,264		0,440	0,473	0,229	0,780	0,636	0,189
0,035	V8	0,000	0,005	0,003	0,422	0,769	0,598	0,440		0,922	0,664	0,621	0,871	0,620
0,03	V9	0,000	0,001	0,001	0,414	0,697	0,556	0,473	0,922		0,567	0,707	0,916	0,546
0,025	V10	0,000	0,039	0,010	0,799	0,909	0,950	0,229	0,664	0,567		0,403	0,570	0,917
0,015	V11	0,000	0,010	0,004	0,336	0,550	0,448	0,780	0,621	0,707	0,403		0,823	0,346
0,01	V12	0,000	0,021	0,005	0,441	0,687	0,586	0,636	0,871	0,916	0,570	0,823		0,536
0	V0	0,001	0,049	0,026	0,897	0,822	0,976	0,189	0,620	0,546	0,917	0,346	0,536	

a) Im gepaarten T-Test bestand ein signifikanter Unterschied zwischen Schädigungen in DNS im Schweif [%] der Lymphozyten bei den beiden Konzentrationsbereichen alkalischer Phosphatase (Endkonzentration: 0,5-50 U/ml versus 0-0,25 U/ml) mit $p \leq 0,05$ (Tab. 12, abgesehen vom Wertepaar V2-V4 mit $p=0,052$).

In vitro ist eine Aktivierung von 50 (bzw. initial 100) $\mu\text{g/ml}$ Amifostin ab 0,5 (bzw. initial 1) U/ml alkalischer Phosphatase durch den radioprotektiven Effekt nachweisbar.

b) Innerhalb der Gruppen – aktiviertes (V1-V3) gegen nicht aktiviertes (V4-V12, und Nullprobe V0) Amifostin bestehen keine signifikanten Unterschiede.

c) In vitro werden 100 $\mu\text{g/ml}$ Amifostin zu WR-2711 ab einer Mindestkonzentration alkalischer Phosphatase von 1U/ml aktiviert (Anfangskonzentration).

d) Die Reproduzierbarkeit des Comet Assays wird durch Annahme der Nullhypothese innerhalb der zwei Gruppen - aktiviertes (V1-V3) und nicht aktiviertes (V4-V12, und Nullprobe V0) Amifostin – bestätigt.

2. Einfluß der Inkubationszeit bei Enzym und Wirkstoff

Es sollten die Auswirkungen der einzelnen Variablen (Amifostin, alkalische Phosphatase, Inkubationszeit von Amifostin und alkalischer Phosphatase) auf die Radiosensibilität getestet werden. In Tab. 13 wird der Versuchsaufbau beschrieben.

Tab.13: Sechs verschiedene Kombinationen der drei Variablen (Zugabe von Amifostin, Zugabe von alkalischer Phosphatase und die jeweilige Inkubationszeit) wurden bezüglich ihres Einflusses auf die Radioprotektion von Lymphozyten nach Bestrahlung mit 6 Gy überprüft (n=50).

Kombination	Amifostin [$\mu\text{g/ml}$]	AP [U/ml]	Inkubation bei 37 °C [min]
1	0	0	0
2	1000	0	0
3	0	210	0
4	1000	210	0
5	1000	210	15
6	1000	210	30

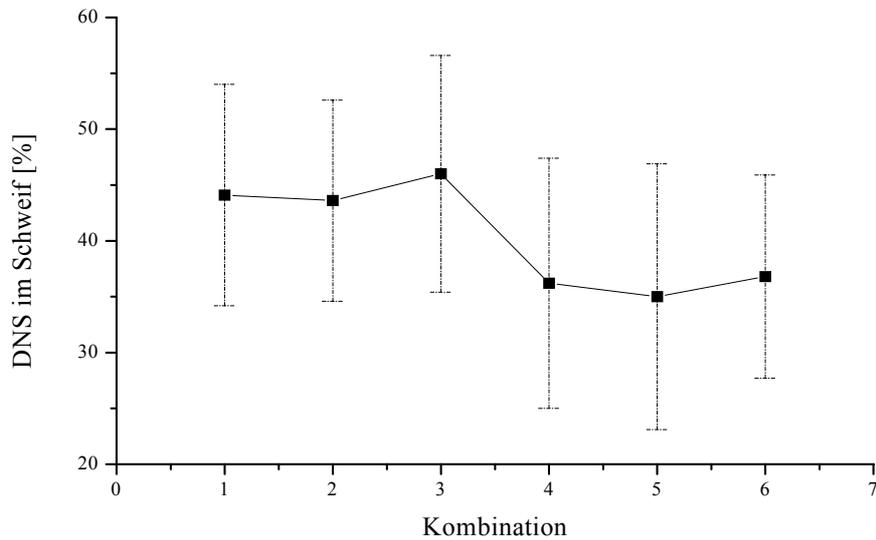


Abb.15: Darstellung der sechs Kombinationen (Tab. 13) in Abhängigkeit vom DNS-Schaden (DNS im Schweif [%]) nach Bestrahlung mit 6 Gy. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen (n=50).

Aus der graphischen Darstellung sind zwei Schadensniveaus erkennbar: Kombination 1-3 bei durchschnittlich 46 % DNS im Schweif und Kombination 4-6 bei gemittelt 36 % DNS im Schweif. Mit dem gepaarten T-Test wurde das Experiment statistisch ausgewertet (Tab. 14).

Tab.14: Darstellung der zweiseitigen Signifikanzen des gepaarten T-Tests für die 6 Kombinationen (Tab.13).

Kombination	1	2	3	4	5	6
1		0,819	0,228	0,001	0,000	0,000
2	0,819		0,220	0,000	0,000	0,000
3	0,228	0,220		0,000	0,000	0,000
4	0,001	0,000	0,000		0,579	0,781
5	0,000	0,000	0,000	0,579		0,401
6	0,000	0,000	0,000	0,781	0,401	

- a) Die alleinige Zugabe von Amifostin (2) oder alkalischer Phosphatase (3) hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Radiosensitivität bei isolierten Lymphozyten (getestet gegen Experiment 1 ohne jeglichen Zusatz).
- b) Nach Zugabe von aktiviertem Amifostin war eine Radioprotektion mit hoher Signifikanz bei isolierten Lymphozyten nachweisbar (Experiment 4 bis 6 gegeneinander im Paarvergleich getestet).
- c) Die Inkubationszeit von Amifostin mit alkalischer Phosphatase hatte bei den gewählten Konzentrationen der Substanzen keine signifikante Auswirkung auf das Ausmaß der Radioprotektion (Experiment 4 bis 6 gegeneinander geprüft).

Der radioprotektive Effekt war nach unterschiedlicher Inkubationszeit gleich groß zu bewerten. Der DMF betrug für Versuch 4: 0,82; Versuch 5: 0,80; Versuch 6: 0,84. Im Mittel wurde die Radiosensitivität durch WR-2711 um 18 % bei isolierten Lymphozyten in vitro reduziert.

d) Zwischen den Experimenten 1 bis 3 sowie zwischen 4 bis 6 bestand kein signifikanter Unterschied, welches als weiterer Nachweis der Reproduzierbarkeit des Comet Assays gewertet wurde.

3. Radioprotektion bei unterschiedlichen Energiedosen und Reparatur

Die Radioprotektion durch Amifostin und der DMF wurden an steigenden Energiedosen untersucht. Jeweils bei 37 °C wurden 140 U/ml alkalische Phosphatase mit 1000 µg/ml Amifostin für 15 min inkubiert und für weitere 15 min mit der Lymphozytensuspension im Verhältnis 1:3 versetzt. Es resultierte eine Verdünnung auf ein Viertel (alkalische Phosphatase 35 U/ml und Amifostin 250 µg/ml) in der Lymphozyten-RPMI-FKS-Lösung. Nach der Bestrahlung erfolgte die Inkubation für 10 bzw. 60 min im Reparaturmedium bei 37 °C. Entsprechend dem Protokoll wurden Energiedosiswirkungskurven (0 bis 8 Gy bei 0 min) und Reparaturkurven (10 und 60 min) für Proband 1 und Proband 9 erstellt. Die statistische Auswertung wurde mit dem gepaarten T-Test durchgeführt (Tab. 15 und 16).

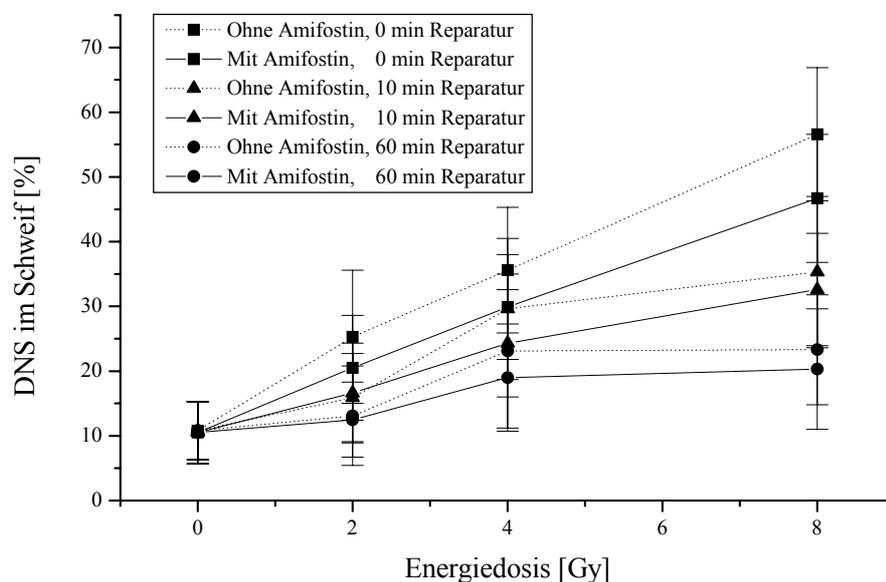


Abb. 16: Energiedosiswirkungskurven nach 0, 10 60 min Reparatur bei isolierten Lymphozyten von Proband 1 ohne und mit Amifostin. Mit Amifostin (Endkonzentration): 250 µg/ml Amifostin wurden mit 35 U/ml alkalischer Phosphatase aktiviert; Schädigungsparameter war DNS im Schweif [%]. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung (n=50).

Tab. 15: Gepaarter T-Test (ohne/mit Amifostin, Abb. 16) und DMF der Energiedosiswirkungskurven mit Reparatur bei isolierten Lymphozyten von Proband 1; Schädigungsparameter war DNS im Schweif [%]. Zweiseitige Signifikanz (Sig. zweiseitig), Prüfgröße (T), Freiheitsgrad (df).

Energiedosis [Gy]	Reparaturzeit [min]	T	df	Sig. zweiseitig	DMF
0	0	0,31	49	0,755	0,97
2	0	2,51	49	0,015	0,81
2	10	-0,53	49	0,601	1,05
2	60	0,46	49	0,651	0,95
4	0	3,16	49	0,003	0,84
4	10	2,71	49	0,009	0,82
4	60	1,99	49	0,053	0,82
8	0	6,37	49	0,000	0,74
8	10	1,33	49	0,191	0,92
8	60	1,60	49	0,115	0,87

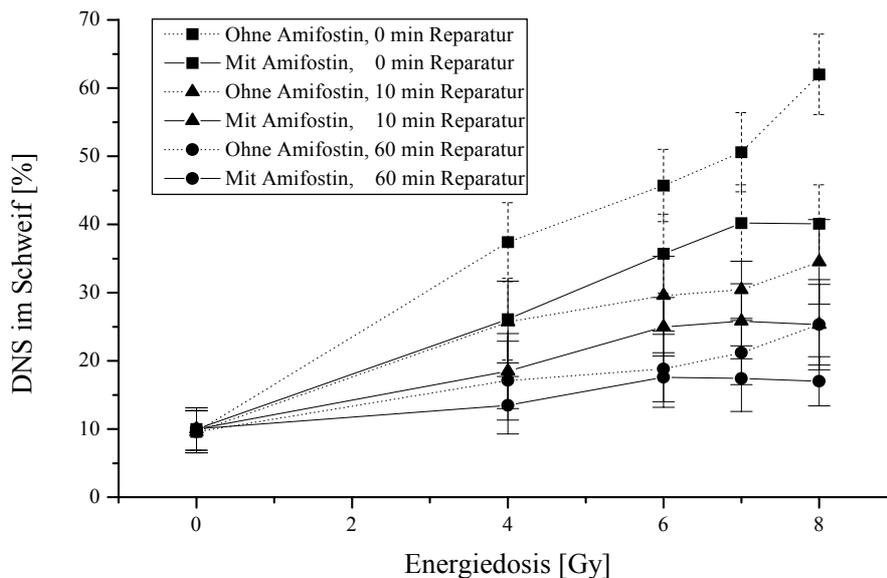


Abb.17: Energiedosiswirkungskurven nach 0, 10 und 60 min Reparatur bei isolierten Lymphozyten von Proband 9 ohne und mit Amifostin. Mit Amifostin (Endkonzentration): 250 µg/ml Amifostin wurden mit 35 U/ml alkalischer Phosphatase aktiviert; Schädigungsparameter war DNS im Schweif [%]. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung (n=50).

Die Verwendung von höheren Einzeldosen bei Proband 9 erklärte sich aus der geringeren Trennschärfe der Daten im niedrigeren Energiedosisbereich (bei 2 Gy von Proband 1).

Tab.16: Gepaarter T-Test (ohne/mit Amifostin, Abb. 17) und DMF der Energiedosiswirkungskurven mit Reparatur bei isolierten Lymphozyten von Proband 9; Schädigungsparameter war DNS im Schweif [%]. Zweiseitige Signifikanz (Sig. zweiseitig), Prüfgröße (T), Freiheitsgrad (df).

Energiedosis [Gy]	Reparaturzeit [min]	T	df	Sig. zweiseitig	DMF
0	0	-0,39	49	0,699	1,05
4	0	5,18	49	0,000	0,79
4	10	3,05	49	0,004	0,72
4	60	2,15	49	0,036	0,70
6	0	4,14	49	0,000	0,94
6	10	2,43	49	0,019	0,84
6	60	0,70	49	0,486	0,78
7	0	4,44	49	0,000	0,82
7	10	2,51	49	0,015	0,85
7	60	2,06	49	0,045	0,79
8	0	9,49	49	0,000	0,67
8	10	4,02	49	0,000	0,73
8	60	4,01	49	0,000	0,65

Tab.17: Mittelwerte der DMF (DMF-MW) von Tab. 15 und 16 in Abhängigkeit von Energiedosis [Gy] und Reparaturzeit [min] von Proband 1 und 9. Mittelwert der Initialschäden (MWI), Mittelwert der Residualschäden (MWR), Gesamtmittelwert (MW).

[Gy]	DMF-MW von Proband 1	DMF-MW von Proband 9	DMF-MW
2	0,94	-	0,94
4	0,83	0,74	0,785
6	-	0,85	0,85
7	-	0,82	0,82
8	0,84	0,68	0,76
[min]	DMF-MW von Proband 1	DMF-MW von Proband 9	DMF-MW
0	0,80	0,81	0,805
10	0,94	0,79	0,865
60	0,88	0,73	0,805
MWI	0,80	0,81	0,805
MWR	0,91	0,76	0,835
MW	0,87	0,78	0,825

Die Zwischenergebnisse von a-d beziehen sich auf die **Initialschäden**:

- a) Es war für jede applizierte Energiedosis (2 bis 8 Gy) eine signifikante Radioprotektion mit Amifostin nachweisbar.
- b) Ohne Bestrahlung (0 Gy 0 min) bestand kein verminderter DNS-Schaden mit Amifostin.
- c) Die DMF waren probandenabhängig. Der mittlere DMF (MW) betrug 0,87 (größter DMF: 0,74) bei Proband 1 und 0,78 (größter DMF mit 0,65) bei Proband 9. Der Mittelwert der DMF (MW) beider Probanden betrug 0,82.
- d) Eine stetige Zunahme des DMF mit der Energiedosis war nicht zu beobachten, obwohl die größte Dosismodifikation bei der höchsten Energiedosis auftrat. Möglicherweise existiert ein probandenabhängiges Optimum der Radioprotektion bei einer Energiedosis.

Die Zwischenergebnisse von e-f beziehen sich auf die **Residualschäden**:

- e) Bei Proband 1 war nur bei 4 Gy eine signifikante Radioprotektion in der Reparatur durch Amifostin erkennbar. Bei Proband 9 waren außer bei 6 Gy 60 min alle Schadensniveaus nach Reparatur mit Amifostin signifikant geringer als ohne Strahlenschutzsubstanz. Ursächlich für die Signifikanz bei Proband 9 im Gegensatz zu Proband 1 könnte der größere Initialschadensunterschied nach Amifostin bei Proband 9 sein. Der signifikante Unterschied direkt nach der Bestrahlung wurde über die Zeit beibehalten. Die Parallelität der Reparaturkurven spricht gegen einen zusätzlichen Effekt von Amifostin während der Reparatur.
- f) Aus den DMF ließ sich für beide Probanden ein radioprotektiver Trend in der Reparatur ersehen, der bei Proband 9 signifikant war. Ein deutlicher Unterschied zwischen den DMF nach 0, 10 oder 60 min war nur bei Proband 9 erkennbar, so daß kein einheitliches Ansprechen auf Amifostin vorlag .

4. Reparatur und Konzentration von Amifostin

Zu prüfen war, ob die Konzentration von Amifostin auf das Ausmaß der Radioprotektion bei Reparatur einen Einfluß hat bzw. ob wie bei den Konzentrationswirkungskurven der Initialschäden (Abb. 14 und 15) ein „Alles-oder-Nichts“-Gesetz - im übertragenen Sinne für die Amifostinkonzentration gebraucht - auch bei Reparaturvorgängen Gültigkeit besitzt.

Es wurden entsprechend der gepaarte T-Test durchgeführt (Tab. 18 und 20): Die Reparaturzeit (0 bis 120 min) und die Amifostinkonzentration (0 bis 5000 µg/ml). Bestrahlt wurde mit einer Energiedosis von 6 Gy.

Tab. 18: Bestrahlung der Lymphozyten von Proband 1 bei unterschiedlichen Amifostinkonzentrationen. Dargestellt wurden der gepaarte T-Test und DMF der Energiedosiswirkungskurven mit Reparatur gemäß Abb. 18 als qualitative Fragestellung (DMF mit versus ohne Amifostin). Zur besseren Übersicht wurden die signifikanten Paarvergleiche ($p \leq 0,05$) in kursiven Lettern aufgeführt. Schädigungsparameter war DNS im Schweif [%]. Zweiseitige Signifikanz (Sig. zweiseitig), Prüfgröße (T), Freiheitsgrad (df).

Energiedosis [Gy]	Reparaturzeit [min]	Gepaarte Stichprobenkonzentrationen Amifostin [$\mu\text{g/ml}$]	T	df	Sig. zweiseitig	DMF	
6	0	5000	0	4,51	49	<i>0,000</i>	0,79
6	0	2500	0	2,21	49	<i>0,032</i>	0,88
6	0	1000	0	3,27	49	<i>0,002</i>	0,85
6	0	500	0	3,05	49	<i>0,004</i>	0,84
6	0	250	0	3,26	49	<i>0,002</i>	0,84
6	10	5000	0	-0,93	49	0,356	1,04
6	10	2500	0	0,91	49	0,367	0,96
6	10	1000	0	2,43	49	<i>0,019</i>	0,87
6	10	500	0	0,92	49	0,363	0,96
6	10	250	0	0,20	49	0,840	0,99
6	60	5000	0	3,63	49	<i>0,001</i>	0,68
6	60	2500	0	4,20	49	<i>0,000</i>	0,69
6	60	1000	0	3,15	49	<i>0,001</i>	0,72
6	60	500	0	2,06	49	<i>0,045</i>	0,83
6	60	250	0	1,87	49	0,067	0,84
6	120	5000	0	4,22	49	<i>0,000</i>	0,67
6	120	2500	0	2,88	49	<i>0,006</i>	0,78
6	120	1000	0	1,69	49	0,097	0,88
6	120	500	0	2,54	49	<i>0,000</i>	0,79
6	120	250	0	3,74	49	<i>0,000</i>	0,74

Tab.19: Mittelwerte der DMF (DMF-MW) von Tab. 18 in Abhängigkeit von Amifostinkonzentration [$\mu\text{g/ml}$] und Reparaturzeit [min] von Proband 1.

[$\mu\text{g/ml}$]	DMF-MW von Proband 1
250	0,85
500	0,86
1000	0,83
2500	0,83
5000	0,80
[min]	DMF-MW von Proband 1
0	0,84
10	0,96
60	0,75
120	0,77

Tab. 20: Quantitative Fragestellung: Gepaarter T-Test der DNS-Schädigungen nach 6 Gy bei verschiedenen Amifostinkonzentrationen bei Lymphozyten von Proband 1 (Abb. 18, Tab. 18) mit Darstellung der zweiseitigen Signifikanzen zu den jeweiligen Reparaturzeiten. Zur besseren Übersicht wurden die signifikanten Paarvergleiche ($p \leq 0,05$) in kursiven Lettern aufgeführt.

Paarvergleich verschiedener Amifostinkonzentrationen [$\mu\text{g/ml}$]		Zweiseitige Signifikanzen und jeweilige Reparaturzeiten			
		0 min	10 min	60 min	120 min
0	250	<i>0,002</i>	0,840	0,067	<i>0,000</i>
0	500	<i>0,004</i>	0,363	<i>0,045</i>	<i>0,014</i>
0	1000	<i>0,002</i>	<i>0,019</i>	<i>0,003</i>	0,097
0	2500	<i>0,032</i>	0,367	<i>0,000</i>	<i>0,006</i>
0	5000	<i>0,000</i>	0,356	<i>0,001</i>	<i>0,000</i>
250	500	0,843	0,469	0,888	0,510
250	1000	0,756	<i>0,025</i>	0,094	0,057
250	2500	0,305	0,427	<i>0,043</i>	0,546
250	5000	0,165	0,314	<i>0,037</i>	0,231
500	1000	0,656	0,075	0,063	0,263
500	2500	0,259	0,917	<i>0,043</i>	0,868
500	5000	0,287	0,129	<i>0,023</i>	0,147
1000	2500	0,525	0,095	0,705	0,191
1000	5000	0,118	<i>0,001</i>	0,659	<i>0,006</i>
2500	5000	<i>0,002</i>	0,121	0,936	0,121

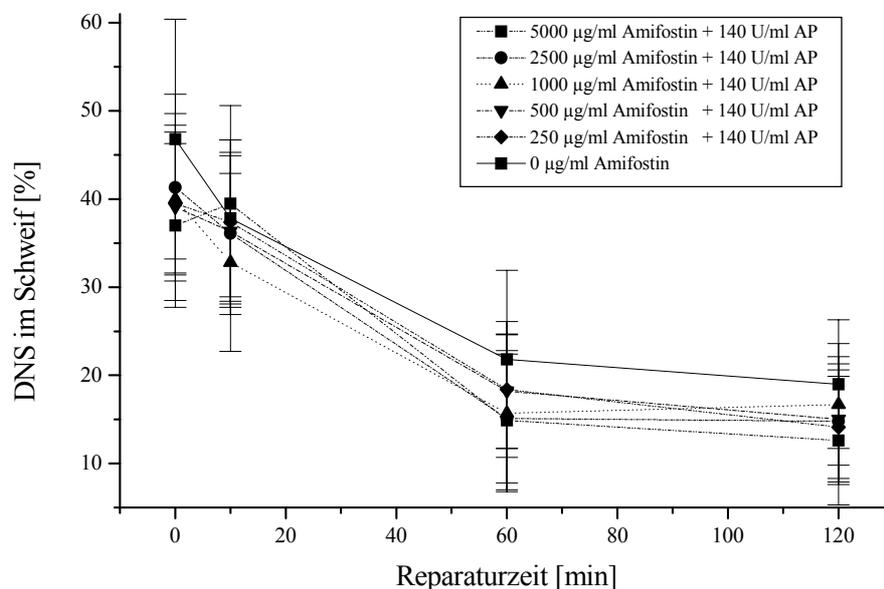


Abb. 18: Reparaturkurven nach 0, 10, 60 und 120 min bei Proband 1 nach Bestrahlung mit 6 Gy und unterschiedlichen Konzentrationen von aktiviertem Amifostin sowie ohne Amifostin; Schädigungsparameter war DNS im Schweiß [%]. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung ($n=50$).

Qualitative Fragestellung (Tab.18 - 19) - mit versus ohne Amifostin:

- a) Die Initialschäden (0 min Reparatur der amifostinhaltigen Proben) unterschieden sich signifikant von der amifostinfreien Probe nach Bestrahlung mit 6 Gy (Tab. 18). Amifostin wirkte im Konzentrationsbereich von 250-5000 µg/ml radioprotektiv.
- b) Nach 10 min Reparatur war abgesehen von einer Probe (1000µg/ml Amifostin) kein Unterschied zwischen den Residualschäden meßbar. In der ersten (exponentiellen) Phase der Reparatur war die Strahlenschutzwirkung durch Amifostin vernachlässigbar.
- c) Nach 60 und 120 min Reparatur war der radioprotektive Effekt wieder signifikant nachweisbar (ausgenommen 250 µg/ml Amifostin nach 60 min Reparatur und 1000 µg/ml Amifostin nach 120 min Reparatur).
- d) Die Amifostinwirkung ist möglicherweise abhängig von der Reparaturphase, den Probanden und äußeren Einflüssen (alimentäre Radikalfänger) und vom Initialschadensniveau.
- e) Bei der Reparaturzeit von 60 min waren die DMF am niedrigsten.

Quantitative Fragestellung (Tab. 20) - Einfluß verschiedener Amifostinkonzentrationen:

- f) Die größte Dosismodifikation lag bei der höchsten Amifostinkonzentration vor. Die Radioprotektion ließ sich durch sehr hohe Amifostinkonzentrationen (5000 µg/ml) geringgradig auf einen durchschnittlichen DMF von 0,80 steigern.
- g) Wenn die Konzentrationen in einen unteren (250-500 µg/ml) und einen oberen (2500-5000 µg/ml) Bereich aufgegliedert wurden, konnte ein konzentrationsabhängiger signifikanter zusätzlicher radioprotektiver Einfluß bei der Reparatur nach 60 min beobachtet werden.

3.3

Amifostin in vivo

Sechs Patienten mit Rektumkarzinom erhielten im Rahmen der klinischen Phase-II-Studie zur postoperativen Radiochemotherapie mit 5-Fluoruracil den Radioprotektor Amifostin (500 mg absolut). Die Patientencharakteristik wurde unter 2.11.2 erläutert. Vor und nach der Radioprotektorgabe (ohne radio- oder chemotherapeutische Vorbehandlung) wurde den Patienten Blut entnommen und in vitro mit Energiedosen von 0 bis 8 Gy bestrahlt. Die Reparaturmessungen wurden zu diesem Zeitpunkt erst in die Laborpraxis eingeführt. Daraus erklärt sich die Verwendung von PBS- und RPMI-Agarosen als auch die bei vier (von sechs) Patienten erfolgte In-vitro-Reparatur. Die Wirkung von Amifostin wurde anhand des DMF und des prozentualen DNS-Gehalts im Schweif (gepaarter T-Test) in Tab. 21 und 22 überprüft. In Tab. 21 sind die Daten für Energiedosis und Reparaturzeitpunkt und in Tab. 22 patientenbezogen ausgewiesen.

Tab. 21: Gepaarter T-Test (zweiseitige Signifikanz) des prozentualen DNS-Gehalts im Schweif bei 6 Patienten (Tab. 4) vor und nach Amifostingabe (500 mg absolut) in Abhängigkeit von Energiedosis und Reparaturzeit mit zugehörigem DMF. Pro Patient wurden 50 Einzelwerte gemessen; Prüfgröße (T), Freiheitsgrad (df).

Energie-dosis [Gy]	Reparatur-zeit [min]	T	df	Signifikanz (zweiseitig)	DMF
0	0	3,54	249	0,000	0,85
0,7	0	4,54	99	0,000	0,80
1	0	3,60	99	0,001	0,85
2	0	7,44	299	0,000	0,84
4	0	10,01	299	0,000	0,86
8	0	3,70	149	0,000	0,94
0	10	2,33	199	0,021	0,86
2	10	3,44	199	0,001	0,84
4	10	5,58	199	0,000	0,83
8	10	2,22	199	0,027	0,95
0	60	-0,32	199	0,752	1,02
2	60	2,16	199	0,032	0,89
4	60	2,98	199	0,003	0,87
8	60	5,45	199	0,000	0,80

Tab. 22: Darstellung des durchschnittlichen DMF in Abhängigkeit von der Reparaturzeit bei PBS- und RPMI-Agarose (n=50) bei 6 Patienten (Tab. 4) vor und nach Amifostingabe (500 mg absolut). Die Berechnung der DMF erfolgte unter Ein- und Ausschluß der nicht bestrahlten Präparate (0 Gy-Werte). DMF-P: Patientenbezogene DMF; DMF-MW: Mittelwerte der DMF.

Patient	Agarose	Reparatur mit 0 Gy-Werten				Reparatur ohne 0 Gy-Werte			
		DMF-P	0 min	10 min	60 min	DMF-P	0 min	10 min	60 min
1	PBS	0,90	0,90	-	-	0,87	0,87	-	-
4	PBS	0,92	0,92	-	-	0,93	0,93	-	-
2	RPMI	0,84	0,83	0,87	0,80	0,81	0,85	0,84	0,75
3	RPMI	0,80	0,76	0,82	0,83	0,79	0,77	0,85	0,74
5	RPMI	0,93	0,91	0,85	1,03	0,94	0,90	0,92	0,99
6	RPMI	0,89	0,85	0,87	0,94	0,87	0,85	0,81	0,94
Gesamt		0,88	0,86	0,85	0,90	0,87	0,86	0,85	0,86
Gesamt	DMF-MW				0,87				0,86

- a) Nach Bestrahlung war die DNS der Blutzellen mit Amifostininfusion (500 mg absolut) signifikant geringer geschädigt ($p \leq 0,05$, Tab. 21).
- b) Ohne Bestrahlung (Nullproben) war die Zytoprotektion inkonstant (bei 0 Gy, 0 und 10 min) vorhanden. Die durchschnittlichen DMF aller Proben unterschieden sich mit 0,86 (ohne Einbeziehung der Nullproben) bzw. 0,87 (mit Nullproben) kaum (Tab. 22), welches auch für die patientenbezogenen DMF-Werte mit 0,87 versus 0,88 galt.
- c) Es war keine Abhängigkeit des DMF von der Reparaturzeit ersichtlich.
- d) Bei Verwendung von PBS-Agarose resultierte eine etwas geringere Dosismodifikation durch Amifostin als mit RPMI-Agarose.
- e) Die durchschnittliche Dosismodifikation war patientenabhängig (DMF-P, Tab. 22) und lag im Bereich von 0,80 bis 0,93 mit Nullproben bzw. bei 0,79 bis 0,94 ohne Nullproben.

Gegenstand der Untersuchungen war die Prüfung einer möglichen radioprotektiven Wirkung von Amifostin. Dafür wurden Zitratblut und isolierte Lymphozyten mit Gammastrahlen unterschiedlicher Dosierung bestrahlt und der resultierende DNS-Schaden mit dem Comet Assay gemessen. Zunächst war die Frage nach der Eignung des Meßverfahrens zu beantworten.

4.1 Reproduzierbarkeit des Comet Assays

4.1.1 Auswahl der Meßparameter

Für die Quantifizierung des DNS-Sumimationsschadens im Comet Assay werden in der Regel die unter 2.10.3 beschriebenen Basisparameter DNS im Schweif in % und die **Schweiflänge** in μm benutzt; üblich ist zudem die Verwendung des als Kometenmoment bezeichneten Produkts beider Parameter [86]. Durch Einführung von Korrekturfaktoren und speziellen Festlegungen für die Schweiflängenmessung werden die Basisparameter auch in modifizierter Form angewendet [15].

Eine repräsentative Energiedosiswirkungskurve (Tab. 8) ist in Abb. 19 zum Parametervergleich in den drei grundlegenden Maßen aufgetragen. Die Schweiflänge nimmt nur im unteren Dosisbereich bis 2 Gy mit steigender Energiedosis zu (lineare Energiedosiswirkungskurve). Bei höheren Energiedosen erreicht sie ein Plateau [49,100] und ist dann weitgehend unabhängig von der Bestrahlungsdosis [77]. Wegen der ab 2 Gy abnehmenden und im oberen Energiedosisbereich fehlenden schadensproportionalen Schweiflängenzunahme (Sättigungscharakter) wurde dieser Parameter nur bei der Frage nach dem Einfluß unterschiedlicher Gele auf das Wanderungsverhalten der DNS verwendet. Im Bereich von 0 bis 8 Gy sind für DNS im Schweif in % [15,60] und das Kometenmoment [11,49] lineare Energiedosiswirkungskurven beschrieben. In Abb. 19 ist dieser Zusammenhang ersichtlich. Das **Kometenmoment** entspricht dem Produkt von Schweiflänge [μm] und DNS im Schweif [%]. Aus methodischer Sicht kam es deshalb als DNS-Schadensmaß nicht in Frage, da es den Faktor Schweiflänge beinhaltet. Des weiteren zeigten Hellman et al., daß Schweife mit verschiedenen Schweiflängen und differierendem prozentualen DNS-Gehalt im Schweif den gleichen Kometenmoment aufwiesen [42]. Unabhängig davon ist in beiden unteren Kurven ein ähnlicher schadensproportionaler Verlauf erkennbar [91], der mit anderen Arbeiten konsistent ist [15,60].

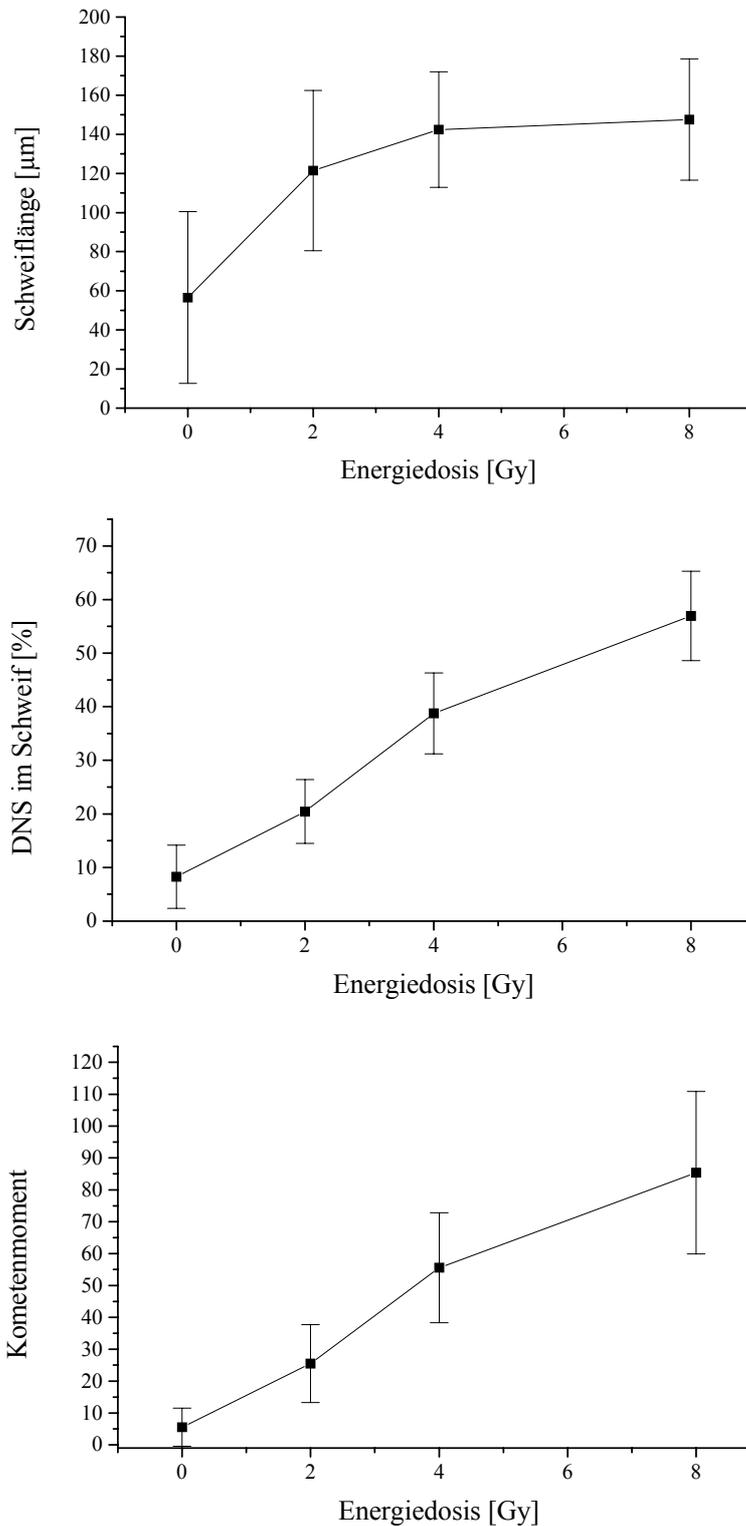


Abb. 19: Energiedosiswirkungskurve von Blutzellen (Tab. 8) mit den Parametern Schweiflänge in µm, % DNS im Schweif und dem Kometenmoment dargestellt.

Die leichte Abnahme des Anstiegs der unteren beiden Diagramme ist meßtechnisch bedingt: Kometenformationen weisen nach 8 Gy Bestrahlung im Durchschnitt 60% (Spannbreite im Bereich von 45-80%) DNS im Schweif auf. Ab 70% DNS im Schweif wird es schwieriger

die Köpfe vom Schweif zu unterscheiden. Bei fehlender Differenzierbarkeit der Kopf-Schweif-Grenze werden die Kometen von den Messungen ausgeschlossen. Solche stark zerstörten Zellen werden ab ca. 80 % zu den nekrotischen und ab 95 % DNS im Schweif zu den apoptotischen Zellen gerechnet [9,75]. Dieser Zusammenhang gilt auch für den Kometenmoment. Es ist also bei Energiedosen über 8 Gy mit einer methodikbedingten Empfindlichkeitsabnahme bei dieser Form des Assays zu rechnen.

Wegen der gewählten Energiedosisverteilung (0 bis 8 Gy) und der Präferenz für direkt gemessene Daten wurde in dieser Arbeit DNS im Schweif [%] zur Bestimmung des DNS-Schadens präferiert. In der Literatur wird dieses Maß vielfach akzeptiert [15].

Zur Bestimmung des Mittelwertes für eine Dosis oder einen Reparaturzeitpunkt wurden jeweils 50 Kometenmessungen herangezogen. Bei Lymphozyten werden 25 [62,71] und bei heterogeneren Zellarten (Spermatozyten) 30 Kometen [45] als aussagekräftig für eine Population angesehen. Mit insgesamt 50 pro Mittelwert gemessenen Zellen ist also eine repräsentative Kometenanzahl ausgewertet worden.

4.1.2 Reparatur

Bei der Festlegung der Reparaturzeiten waren folgende Einzelheiten ausschlaggebend. Die Reparatur der Zellen unterliegt einer Kinetik von zwei Phasen. Die **schnelle Reparaturphase** dauert bei Lymphozyten ca. 10 bis 15 min. In ihr werden mehr als 50 % des Initialschadens repariert [54,68,102]. Zur Messung dieser Phase wurde der Residualschaden nach 10 min quantifiziert. Während der **langsamen Reparaturphase** (Dauer 15 bis 120 min) ist nach ca. 25 bis 40 min eine leichte vorübergehende Schadenszunahme (im Vergleich zum Residualschaden nach 15 min) zu beobachten. Sie wird mit der Bildung von Einzelstrangbrüchen während der Exzisionsreparatur von Basenschäden begründet [63]. Durch das Rejoining der reparierten Fragmente nimmt der DNS-Anteil im Schweif im weiteren Verlauf wieder ab. Nach 120 min ist der restliche Schaden beseitigt [99]. Zur Abschätzung der Reparaturkapazität eignet sich der Residualschaden nach 60 min Reparatur besonders, da zum einen suboptimale nutritive Bedingungen vermieden werden und zum anderen interindividuell unterschiedliche (verzögerte) Rejoiningkinetiken eben noch abgrenzbar bleiben [3]. In den Experimenten (mit Amifostin und alkalischer Phosphatase) ist die marginale Residualschadensdifferenz zwischen den Reparaturwerten nach 60 und 120 min aufgezeigt worden. Die Dosismodifikation war nach 60 min größer als nach 120 min (Tab. 19), welches mit sich verschlechternden nutritiven Bedingungen korrelieren könnte. Wegen der nahezu abgeschlossenen Reparatur nach 60 min wurde dieser Endpunkt am häufigsten verwendet.

4.1.3 Wiederholbarkeit innerhalb eines Experiments

Unter 3.1.1 und 3.1.2 wurde die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Experiments statistisch nachgewiesen. Soweit bekannt, ist die Vergleichbarkeit der Werte erstmals für eine so große Anzahl, von insgesamt 21 gleichartig präparierten Objektträgern nach Initialschädigung mit 2 Gy mit dem allgemeinen linearen Modell statistisch belegt worden. Diese hohe Reproduzierbarkeit war auch bei den Reparaturuntersuchungen statistisch signifikant. Anhand der „whiskers“ ist eine über die Werte gleichmäßig verteilte Heterogenität erkennbar. Als Kernaussage läßt sich ableiten: Die „biologische“ Heterogenität ist konstant [110], die „methodische“ Variabilität gering [54,74]. Alle äußeren Einflüsse wie die Zeitdifferenz beim Überführen der einzelnen Präparate in die verschiedenen Lösungen, Feldschwankungen der Elektrophorese und präparatorische Einflüsse konnten auf ein Minimum reduziert werden, so daß eine Methode zur Verfügung steht, die innerhalb eines Experiments eindeutig reproduzierbare Schadensmessungen gewährleistet.

Die Versuche wurden mit der am häufigsten im klinischen Alltag genutzten Einzeldosis von 2 Gy durchgeführt. Ein weiterer Beleg für die sichere Wiederholbarkeit des Comet Assays sind die unter 3.2 aufgeführten Experimente mit dem Prodrug Amifostin, bei denen ohne Radioprotektion die Kurven der DMF für 0,7 und 2 Gy der Probanden nahezu parallel zur Abszisse verlaufen. Die gezeigte Reproduzierbarkeit des Assays ist konform mit anderen Untersuchungen [23,24,45].

4.1.4 Wiederholbarkeit der Experimente zu verschiedenen Zeitpunkten

Bei Wiederholung der Experimente zu unterschiedlichen Zeitpunkten sind die Grenzen systematischer Einflüsse der Methodik von biologischen Einflüssen schwer zu trennen. Im Hinblick auf die gute intraexperimentelle Reproduzierbarkeit (3.1.1 und 3.1.2) treten zeitliche Einflüsse innerhalb des Versuchs in den Hintergrund (Überführung der Objektträger in andere Lösungen). Sie nehmen sogar weiter ab, da nicht mehr 21 Objektträger gleichzeitig präpariert werden, sondern nur noch 2 Objektträger pro Dosis bzw. Reparaturzeitpunkt gleicher Art sequentiell erstellt werden. Der Elektrophoreseeinfluß kann vernachlässigt werden, da bei jedem Experiment durch die Pufferzugabe eine Stromstärke von 296-298 mA und eine Spannung von 14 V eingestellt wurde. Durch die Verwendung von Gebrauchsmaterial derselben Charge und Chemikalien analytischer Reinheit reduzieren sich weitere Außenfaktoren.

Der methodische Unterschied zu den Experimenten unter 3.1.1 und 3.1.2 ist die jeweils neue Eichung des Systems an der entsprechenden Nullprobe (die Wahl der Helligkeit bzw. des Kontrasts zwischen Vorder- und Hintergrund). Die Helligkeitseinstellung mußte selten - und dann in sehr engen Grenzen - angepaßt werden. Bei einem starken Einfluß dieses Parameters wären unterschiedliche Basalschäden zwischen den Experimenten zu erwarten gewesen. Unter 3.1.3 kann diese Form einer systematischen Verschiebung der Werte widerlegt werden. Es bleibt die biologische Variabilität des Probanden über die Zeiträume. Die Blutzellverteilung schwankte leicht. Lankinen et al. [54] zeigten, daß die Unterschiede zwischen Lymphozyten und Granulozyten nach Bestrahlung nicht signifikant waren. Folglich ist die schon geringe Variabilität der Zellproportionen noch weniger bedeutsam.

Vorhandene intra- und extrazelluläre Radikalfänger können die bei Bestrahlung entstehenden Wasserradiolyseprodukte reduzieren. In diesem Zusammenhang kann die Ernährung größeren Einfluß auf den Radikalfängerpool und damit die Strahlenwirkung gewinnen. Vitamine wurden mit dem Comet Assay weitgehend untersucht [4,13,27,31,40]. Allerdings ist kein einheitliches Verhalten beim Einsatz von Vitaminen auf die Radiosensitivität aus der Literatur ableitbar [86]. Die tägliche und tageszeitliche Konzentration der Vitamine kann mit dem Nahrungsangebot variieren, so daß sich vielfältige Interaktionsprofile ergeben. Physische Aktivität [41], Umweltfaktoren [12,26,33], Genußgewohnheiten wie Rauchen [27] und Koffein [8] verbreitern das Spektrum der Einflüsse auf die im Comet Assay gemessene Radiosensitivität.

Die Experimente mit **Blutzellen** nach ein bzw. drei Monaten waren abgesehen von einem Präparat (4 Gy) reproduzierbar, so daß probandenspezifische Umwelteinflüsse eine relativ geringe Auswirkung auf die Radiosensitivität hatten (oder aber kaum Änderungen dieser Faktoren auftraten). Dabei könnte bei dem Präparat nach Bestrahlung mit 4 Gy (Proband 1) erst die Summation veränderlicher Einflüsse zu dem signifikant unterschiedlichen DNS-Schaden geführt haben. Zu den Einflüssen zählen die unterschiedliche Leukozytenverteilung, die größte untersuchte Zeitspanne (3 Monate) und andere bereits genannte.

Bei der homogeneren Population, den **Lymphozyten**, waren auch bei dem Präparat mit der höchsten applizierten Energiedosis (8 Gy) in dem Zeitfenster von zwei bis drei Tagen alle Kometenauswertungen reproduzierbar. Entsprechend konnten Singh et al. [101] bei Kontrollexperimenten die Reproduzierbarkeit an zwei aufeinanderfolgenden Tagen demonstrieren. Insgesamt betrachtet, ist in kurzen (bis zu einem Monat) Zeitabständen die Reproduzierbarkeit des Comet Assays bei PBS- und RPMI-Agarose gewährleistet.

Collins et al. [23] beschreiben bei Versuchen zur intraindividuellen Variabilität im Abstand von mehreren Wochen keine signifikanten Unterschiede aber eine abnehmende -

variabilitätsbedingte - Korrelation der Wertepaare. Bei den eigenen Ergebnissen war die Wiederholbarkeit der Experimente bei Verwendung von Energiedosen bis 2 Gy bis zu einem Vierteljahr gegeben. Über noch längere Zeitabstände kann keine Aussage gemacht werden. Selbst bei der genannten Fülle von Faktoren, die sich egalieren oder verstärken konnten, ist eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet gewesen. Die Disziplin der Probanden bezüglich der unter 2.11.1 beschriebenen Bedingungen war dabei maßgebliche Voraussetzung. Schlußfolgernd aus dem ungleichen Reparaturverhalten von Gesamtblut und Lymphozyten sollten zur sicheren Vergleichbarkeit von Experimenten gleiche Zellarten verwendet werden.

4.1.5 Fluoreszenzmikroskopische Schadensmanifestation und Bildanalyse

Die computergestützte Bildanalyse ist weitverbreitet und bietet den Vorteil von feineren Schadensgraduierungen bei weniger auszuzählenden Zellen gegenüber der visuellen Auswertung in Schädigungsklassen. Sie ist die Methode der Wahl [60]. Verwendung findet sie bei der Identifizierung von Subpopulationen, wie zum Beispiel der apoptotischen Fraktion [75,98]. Bei den apoptotischen Zellen kann auch das unter 4.1.1 beschriebene Problem der korrekten Kopf-Schweif-Abgrenzung bestehen, so daß hierbei die visuelle Messung Vorteile aufweisen kann.

An der dargestellten Bildauswahl ist exemplarisch die präparative Genauigkeit und die sowohl visuell als auch in % DNS im Schweif erkennbare DNS-Schadenzunahme bei steigender Energiedosis feststellbar. Die Abbildungen sind mit Kometendarstellungen anderer Arbeiten vergleichbar [15,50].

Die Auswahl des Fluoreszenzfarbstoffes ändert nicht die Sensitivität des Assays [77]. Zur Verminderung von Farbstoffkristallen (Ethidiumbromid) auf der Agarose wurde nach der Färbung mehrfach mit Aqua dest. gespült, um eine Beeinflussung der HintergrundEinstellung zu vermeiden. Wie schon unter 4.1.3 und 4.1.4 dargelegt, war dieser Einfluß innerhalb eines und zwischen zwei Experimenten an Zellen gleicher Herkunft vernachlässigbar. Mit der vorliegenden Version des Auswerteprogramms Komet 3.1 konnte die Radiosensitivität von Blutzellen im Energiedosisbereich von 0 bis 8 Gy reproduzierbar (3.1.1 und 3.1.2) erfaßt werden.

Die Verwendung unterschiedlicher Agaroselösungsmittel (PBS und RPMI) führte zu anderem Wanderungsverhalten (kürzere und prozentual stärker geschädigte Kometen mit PBS). Eine mögliche Erklärung für die höhere Schweifintensität bei geringerer elektrophoretischer Wanderung könnte eine stärkere Fluoreszenz von sich überlagernden DNS-Fragmenten im Schweif sein. Wiederholungsexperimente mit unterschiedlichen Agarosen waren bedingt durch die differierende DNS-Migration im Gel nicht vergleichbar. Deshalb wurden unter 3.1.3 die Messungen zur Reproduzierbarkeit für die einzelnen Agaroselösungsmittel separat geführt. Bei 8 Gy wurden nahezu identische Schweiflängen in PBS- und RPMI-Agarose beobachtet. Dieser Befund korrespondiert mit dem Sättigungscharakter des Meßparameters im oberen Energiedosisbereich.

Agarosekonzentrationsänderungen wurden in anderen Arbeiten schon weitgehend untersucht [10,50], so daß sich hier keine weiteren Experimente anschlossen. Bei der Präparation der Objektträger sind zwei Ausführungen üblich, entweder die Singlelayer- oder die Sandwichlayer-Beschichtung. Die Präparation mit einer Gelschicht ist schneller zu bewältigen aber weniger stabil. Bei der Sandwichlayertechnik wird die Probenschicht von zwei Gelschichten umgeben. Die Gelschichten haften besser auf dem Objektträger und sind deshalb während der präparativen Maßnahmen robuster, zum anderen ist die Möglichkeit einer DNS-Diffusion (bei Zellen an der Geloberfläche) während der Elektrophorese unterbunden. Bei dieser Sachlage war die schnelle Experimentdurchführung weniger entscheidend als die Akuratheit des Assays.

Bei den Experimenten wurden sowohl isolierte Lymphozyten als auch alle kernhaltigen Blutzellen (Leukozyten) zur Messung der Radiosensitivität als Versuchsmaterial verwendet. Die Bestrahlung erfolgte jeweils nach Einbettung im Gel (45 µl auf 1000 µl PBS- bzw. RPMI-Agarose). Dieser Verdünnungseffekt von 1:22 (Blut:Agarose) betraf entsprechend die im Serum enthaltenen Radikalfänger. Ein radioprotektiver Effekt der extrazellulären Radikalfänger [23] könnte dadurch vermindert sein.

Ein Vergleich der **Initialschäden** von isolierten Lymphozyten und allen kernhaltigen Blutzellen des gleichen Spenders zeigte keinen Unterschied. Daraus folgt, daß weder die Radikalfänger noch die andere Zusammensetzung der Zellen (Lymphozyten oder Leukozyten) des Spenders Einfluß auf die Radiosensitivität hatten. Diese Ergebnisse sind mit

einigen Publikationen konsistent, die ein gleiches Ansprechen (Induktion von Einzelstrangbrüchen) bei Granulozyten und Lymphozyten auf Bestrahlung im Dosisbereich von 0 bis 2 Gy zeigten [54].

Im Gegensatz dazu berichten Banath et al. [9] über eine geringere DNS-Schadensinduktion bei verdünntem heparinisiertem Vollblut gegenüber isolierten Lymphozyten. Relativiert wird diese Aussage durch folgende Unterschiede gegenüber der Vorgehensweise in dieser Arbeit: Neben der Messung des DNS-Schadens mit dem Kometenmoment bestand ein ursächlicher präparatorischer Unterschied: Das Blut wurde 1:10 mit Nährmedium verdünnt und in den Tubes (nicht auf Objektträgern) bestrahlt, anschließend mit PBS weiter verdünnt und mit LMP-Agarose als Probenschicht aufgetragen. In eigenen Laborexperimenten bei Ganzkörperbestrahlungen [82] war beobachtet worden, daß immer eine Reparatur bei Messung von Initialschäden nach Bestrahlung im Blutröhrchen, verursacht durch die längere Reparaturzeit, auftrat. Die Reparaturzeit ist bei Banath et al. [9] durch die anschließenden Präparationsschritte (Beschichtung) bis zur Lysis größer als bei der in dieser Arbeit verwandten Objektträgermethode. Hierbei entfallen präparationsbedingte Reparatureinflüsse durch die sofortige Überführung des Objektträgers nach Bestrahlung in die Lyselösung.

Die **Basalschäden** der isolierten Lymphozyten waren größer als die der Leukozyten. Eine Ursache könnten die präparativen Maßnahmen während der Separation sein. Auch eine unterschiedliche Radikalfängerausstattung könnte dieses Ergebnis erklären, da sich die Leukozyten im Serum und die Lymphozyten im RPMI-Medium bis zur Beschichtung befanden. Allerdings hätte sich diese Wirkung dann auch auf die Initialschäden übertragen.

Beim Vergleich der **Residualschäden** reparierten die Blutzellen signifikant schneller als die isolierten Lymphozyten. Diese Beobachtung würde mit der bei Banath et al. [9] gefundenen unterschiedlichen Radiosensitivität der Leukozyten übereinstimmen (wobei die dort gemessenen Initialschäden als Residualschäden anzusehen wären). Ein solcher Trend (nicht signifikant) war auch bei Lankinen et al. [54] vorhanden. Ursache der schnelleren Reparatur bei Blutzellen könnte das physiologischere Reparaturmedium (Serum versus Reparaturmedium) oder eine schnellere Reparatur der Granulozyten per se (größter Anteil der Leukozyten) sein, die sich summarisch bei dem Vergleich von Leuko- mit Lymphozyten auswirkt.

Radiosensitivität ist abhängig vom **Zellzyklus**. Die strahlenempfindlichste Phase ist die Mitose, gefolgt von G₂, G₁ und der S-Phase [43]. Diese Einteilung ist nicht dogmatisch, da, je nach Länge der Phasen, die Radiosensitivität innerhalb einer Phase sich verändern kann und die Strahlenempfindlichkeit der Zellzyklusabschnitte gewebeabhängig ist. Die G₁-Phase ist bei längerer Dauer zum Beginn strahlenresistent und gegen Ende der Phase radiosensibel.

Entscheidend ist der Kondensierungsgrad der DNS. Je kompakter die DNS, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit einer Single-Hit-Kinetik, also die Trefferwahrscheinlichkeit und demzufolge auch die Radiosensitivität [22]. Um Einflüsse der Zellzyklusphasen der Einzelzellen auf die Radiosensibilität zu reduzieren, wurden keine stimulierenden Mitogene, die bei Lymphozytenkurzzeitkulturen in Gebrauch sind, angewandt. Die Lymphozyten befinden sich im Blutkreislauf vorrangig in der G0-Phase [53,65]. Bei Stimulierung durch Mitogene wie Phythämagglutinin erfolgt eine Rekrutierung der Lymphozyten in der G1-Phase [2,35]. Sie hätte die Vergleichbarkeit der Wirkung von Amifostin an Zellen in vivo und in vitro beeinträchtigt, da eine verstärkte Expression der alkalischen Phosphatase in der G1-Phase erfolgt [46]. Die Experimente wären dann mit einer höheren Enzymkonzentration als normalerweise in vivo vorhanden ist, durchgeführt worden.

Blutzellen wurden als **Zellmaterial** bevorzugt, da sie einfach zu gewinnen sind und Amifostin intravenös verabreicht wird, so daß der Kontakt der Substanz mit den Blutzellen gesichert war (3.3). Eine Differenzierung zwischen B- und T-Lymphozyten wurde entsprechend der Laborgegebenheiten nicht vorgenommen. Sie hätte wahrscheinlich den Anteil artifizierlicher Schädigungen nur weiter erhöht (Zunahme des Basalschadens der Lymphozyten).

4.2 Amifostin in vitro

4.2.1 Wirkung des Prodrugs Amifostin bei kernhaltigen Zellen

In den Experimenten wurden an Blutzellen von 11 Probanden mindestens 5 Amifostinkonzentrationen (0 bis 1.000 µg/ml) nach 0,7 und 2 Gy Bestrahlung in vitro untersucht, ohne einen radioprotektiven Effekt (Dosismodifikation) zu messen. In Einzelexperimenten (nicht dargestellt) ergab sich auch bei noch höheren Amifostinkonzentrationen bis 10.000 µg/ml keine Resultatänderung. Demgegenüber war nach Zusatz von alkalischer Phosphatase (3.2.2) oder nach In-vivo-Gabe des Thiols (3.3) eine Radioprotektion ermittelt worden.

Zur Gerinnungshemmung der Blutzellen wurde Zitrat verwendet, um vitale Zellen für die Messung im Comet Assay zu gewinnen. Thomas [108] beschrieb die Hemmung der alkalischen Phosphatase durch Kalziumkomplexbildner wie Zitrat. Der Einsatz von EDTA bei der Entnahme der Blutzellen wäre ebenso mit einer Hemmung der alkalischen Phosphatase verbunden gewesen und bot deshalb keine methodische Alternative [108].

Daraus ist die Schlußfolgerung zu ziehen, daß bei den In-vitro-Experimenten (3.2.1) durch Hemmung der alkalische Phosphatase im Serum und an Leukozyten, Amifostin nicht zum

aktiven Thiol WR-1065 metabolisiert wurde. Deshalb konnte in diesen Experimenten keine Radioprotektion festgestellt werden. Aus der Problematik ergibt sich eine weitere Konsequenz: Das Prodrug Amifostin hat selbst keine radioprotektiven Eigenschaften.

Erst durch die Zugabe (3.2.2) oder das Vorhandensein (3.3) von alkalischer Phosphatase und Amifostin war ein Strahlenschutz ($DMF < 1$) meßbar. Unterstützt wird diese Argumentation durch ähnliche Experimente von Calabro-Jones et al. [21], die eine Radioprotektion an chinesischen Hamsterzellen (V79-171) nach Zugabe von alkalischer Phosphatase und Amifostin nachwies. Dabei war der Strahlenschutz von der intrazellulären Konzentration von WR-1065 abhängig [21,103]. Die gewonnenen Ergebnisse (3.2.2 Unterpunkt 1 und 2) zeigen erneut (wie unter 3.2.1), daß die notwendige Bedingung für einen meßbaren Strahlenschutz das Vorhandensein und die Reaktion beider Agenzien (Enzym und Amifostin) ist.

4.2.2 Alkalische Phosphatase

Die **alkalische Phosphatase im Serum** stammt hauptsächlich aus dem Knochen, der Leber, dem Gallenwegsepithel und dem Dünndarm [92]. Chemisch entspricht das Enzym der Orthophosphomonoesterase. Ihr oberer Normwert beträgt bei Frauen 160 U/l und bei Männern 180 U/l (Normwert des Labors der Klinik). Konzentrationsschwankungen können durch Alterationen an den Herkunftsorganen ausgelöst werden. Multiple Isoenzyme sind differenzierbar [66]. Die membranständige alkalische Phosphatase ist über GPI-Anker (Glykosylphosphatidylinositol-Anker) an Zelloberflächen gebunden, wobei ihre aktive Seite nach außen orientiert ist [44,67,88]. Amifostin wird durch die alkalische Phosphatase der Zellmembranen arterieller Endothelien zum aktiven Thiol hydrolysiert [93]. Romanul und Bannister beschrieben erstmals das Vorkommen des Enzyms an Endothelien kleiner Arteriolen und Kapillaren sowie an Verzweigungsstellen von Arterien [87]. Additiv bei der Aktivierung von WR-2721 könnte auch die alkalische Leukozytenphosphatase wirken.

Die Konzentration und Aktivität der membrangebundenen alkalischen Phosphatasen in vivo ist kaum determinierbar. Pharmakokinetische Daten von Amifostin bieten aber indirekte Hinweise: Die Plasmaclearance beträgt 2,17 l/min [105]. Amifostin wird sehr schnell in Gewebe aufgenommen und zu seinen Metaboliten konvertiert (94 % von WR-2711 sind 6 min nach der Applikation aus dem Plasma eliminiert) [96]. Souid et al. [104] maßen 15 min nach Administration von 825 mg/m² KOF WR-2711 ein Konzentrationsmaximum von 100 µmol/l des aktiven Thiols WR-1065 im Plasma und in Blutzellen.

Die aktive Aufnahme des Metaboliten WR-1065 in die Zelle erfolgt durch einen Polythioltransporter in einigen normalen Geweben [69]. Sie steht einer passiven Diffusion am Tumorgewebe gegenüber [115]. Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich durch die unterschiedlichen Transportmechanismen ein zeitlicher Vorsprung in der Aufnahme des aktiven Thiols in Normalgeweben besonders in Lunge, Niere, Leber und Speicheldrüsen ergibt [109]. Das heißt, der selektive Schutz von gesunden Geweben ist zeitlich limitiert bis zum Äquilibrium durch passive Diffusion. Deshalb sollen sowohl Alkylantien als auch Gammastrahlen sofort nach einer 15-minütigen Infusion von Amifostin appliziert werden [84].

Unter 3.2.2 wurde die **alkalische Phosphatase vom Kälberdarm** verwendet, deren pH-Optimum mit 9,8 dem pH-Optimum des humanem Enzyms entspricht. Shaw et al. beschrieben bei diesem Enzym gute Hydrolyseeigenschaften von Amifostin [95]. Die Zugabe von 1 U/ml=1.000 U/l zu Amifostin führte bereits zu einer signifikanten Radioprotektion (1. Unterpunkt von 3.2.2). Der Bereich zwischen 500 und 1.000 U/l ist die „Grauzone“, in der die ausreichende Aktivierung von 100 µl/ml Amifostin in vitro begann (Abb. 14, durch Verdopplung der dargestellten Endkonzentrationen, erhält man die Anfangskonzentrationen). Die Serumphosphatase würde beim Erwachsenen mit einer oberen Normkonzentration von 160 bis 180 U/l nicht zu einer ausreichenden Aktivierung von Amifostin führen. Bei Jugendlichen (13 bis 17 Jahre) sind jedoch Konzentrationen bis 617 U/l (Labor der Klinik) normal. Diese Enzymkonzentration befindet sich in der beschriebenen „Grauzone“. Hier könnte schon eine Aktivierung der Substanz erfolgen. Wenn man davon ausgeht, daß durch den Kontakt der Substanz mit der endothelständigen alkalischen Phosphatase eine weitere Möglichkeit der Dephosphorylierung zu WR-1065 während des Transports im Blut zu den Zielorganen besteht, würde Amifostin bereits aktiviert in den Geweben anfluten. Damit nimmt die Bedeutung der Enzymausstattung der Gewebe als Mechanismus der Selektion ab (siehe 1.2, zweiter Schritt der Kaskade). Entsprechend berichteten Rasey et al. über eine schlechte Korrelation von Enzymkonzentration und Amifostinwirkung bei animalen Zellen [84]. Der pH-Wert in hypoxischen Tumoren wäre dann genauso wie die Konzentration der alkalischen Phosphatase in Tumoren bedeutungslos für die Aktivierung der Substanz. Diese Folgerungen sind jedoch nur zulässig, wenn die Übertragbarkeit der in vitro erhobenen Daten auf den Menschen möglich ist.

Für die Aufnahme des Thiols in Gewebe könnte der pH-Wert durch Beeinflussung des Dissoziationsgrads und folglich der elektrischen Ladung von Amifostin (+2 bei pH=7) Einfluß gewinnen. Experimente zu elektrostatischen Interaktionen stammen von Zheng et al. [117,118]: Wegen der **positiven Ladung** von Amifostin wird es von der negativ geladenen DNS angezogen. Deshalb besteht auf Seiten des Thiols ein „elektrischen Vorteil“ gegenüber neutralen (Captopril u.a.) oder negativ geladenen (Mesna, Glutathion u.a.) mutmaßlichen zytoprotektiven Stoffen. Bei steigender Ionenstärke nahm die radioprotektive Wirkung von Amifostin deutlich ab. Schlußfolgernd daraus beruht die vielfach geschilderte pH-bedingte Selektivität von WR-1065 für Normalgewebe (im Gegensatz zu hypoxischen Tumoren mit saurem Milieu) am ehesten auf den elektrostatischen Eigenschaften des Thiols und weniger auf dem pH-Optimum der alkalischen Phosphatase.

Die **intrazelluläre Konzentration** von WR-1065 korreliert mit Radioprotektion [21,103]. Daraus folgt, daß extrazellulär (durch die alkalische Phosphatase von Serum und Endothel) aktiviertes Amifostin nur in Abhängigkeit von den Diffusionsoptionen in die Zelle Strahlenschutz vermittelt. Dies folgt auch der Logik, daß das Ziel von Bestrahlung und Strahlenschutz die DNS ist, die intrazellulär lokalisiert ist. Entscheidend bleiben die Selektionsfaktoren für die Distribution von WR-1065: Vaskularisation, pH-abhängiger Ladungszustand und das aktive Polythioltransportsystem.

Amifostin hat durch Aktivierung des redoxsensitiven **nukleären Transkriptionsfaktors κB** ($\text{NF}\kappa\text{B}$) antimutagene und antikarzinogene Eigenschaften [38]. $\text{NF}\kappa\text{B}$ wird durch oxidativen Streß induziert und spielt eine wichtige Rolle bei der Expression weiterer redoxsensitiver Genfamilien. Dazu zählen Zytokine, ihre Rezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren und antioxidative Gene [47]. Amifostin und andere Thiole können $\text{NF}\kappa\text{B}$ auch in Abwesenheit von oxidativem Streß induzieren.

Eines der durch $\text{NF}\kappa\text{B}$ induzierbaren Enzyme ist die **Mangansuperoxiddismutase** (MnSOD). Durch sie werden reaktive Superoxidradikale eliminiert. Das Enzym scheint mit Antikarzinogeneseigenschaften verbunden zu sein: Eine Überexpression von MnSOD in normalen Zellen und Tumoren korreliert mit der Suppression von Wachstum [55]. Über die Akkumulation von Wasserstoffperoxid bei der Detoxifikation von Superoxidradikalen kann das Mikrotubulusnetzwerk alteriert werden, so daß in wachsenden Zellen eine Mitosehemmung resultiert [56]. In den meisten Tumoren ist die MnSOD im Vergleich zu Normalgeweben vermindert [72]. Wenn durch Amifostin dieses antioxidative Enzym in normalen Geweben induziert wird, könnte dadurch die Entstehung von Zweitmalignomen

nach einer Radiotherapie vermindert werden [37]. Bei Bestätigung dieser Hypothese würden sich neue Perspektiven für die Strahlentherapie bei jungen Patienten eröffnen.

Ab 0,01 mmol/l wiesen Grdina et al. **antimutagene Effekte** durch Messung von Mutationen der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase nach [39]. Im Dosisbereich von 0,01 - 4 mmol/l Amifostin war die Senkung der Mutationsrate konstant. Grdina et al. beschrieben eine beginnende Radioprotektion ab 0,1 mmol/l, die bis 4 mmol/l deutlich anstieg [37,39]. Die Messungen erfolgten durch Bestimmung der Überlebensfraktion nach Bestrahlung mit 7,5 Gy bei ovariellen Zellen chinesischer Hamster (CHO-AA8).

Zum Vergleich mit diesen Veröffentlichungen wurden die **Konzentrationsbereiche** der Experimente von 3.2 und 3.3 in mmol/l umgerechnet. Eine Radioprotektion war im gesamten Molaritätsbereich von 0,23 bis 23,46 mmol/l in vitro (50-5000 µg/ml Amifostin) und in vivo durchschnittlich 0,47 mmol/l (500 mg Amifostin absolut) gezeigt worden. In anderen klinischen Studien wurden in vivo Konzentrationen von 1,5-3,85 mmol/l verwendet [47]. Die höheren Konzentration von Amifostin ergeben sich aus der körperoberflächenbezogenen Dosisberechnung und teilweise höheren Dosisregimen wie 740 mg/m² Körperoberfläche.

In den **Experimentaufbau** von 3.2.2 flossen die Erfahrungen von 3.2.1 ein. Bei der Untersuchung des radioprotektiven Effekts von WR-1065 mußte Amifostin vor der Abnahme in Zitratröhrchen (3.3) bzw. vor der Zugabe zu Zellen, die aus Zitratblut gewonnen wurden (3.2.2), aktiviert werden. Unter 3.3 erfolgte die Aktivierung durch die Zeitdauer der Amifostininfusion (15 min). Unter 3.2.2 wurde Amifostin in vitro zu alkalischer Phosphatase gegeben und erst nach verschiedenen Zeiten (0, 15, 30 min) der Inkubation zu den aus Zitratblut isolierten Lymphozyten gegeben. Bei beiden Applikationsweisen konnte eine Radioprotektion ermittelt werden.

4.3 Dosismodifikation durch Amifostin

Der in dieser Arbeit verwendete **dosismodifizierende Faktor (DMF)** entspricht nicht dem Protektionsfaktor, sondern seinem Reziproken. Der DMF wurde so definiert, daß durch Multiplikation mit der vorgesehenen Gesamtdosis für eine Strahlentherapie, die modifizierte - am Gewebe resultierende Energiedosis - berechnet wird. Bei einer geplanten Gesamtdosis von 45 Gy, einem DMF von 0,87 in vivo, ergeben sich bei Verwendung von Amifostin am Gewebe effektiv 39,2 Gy durch die Radioprotektion.

In der Literatur sind **Dosisreduktionsfaktoren (DRF)** oder Protektionsfaktoren (PF) in Gebrauch. Wenn man die in dieser Arbeit berechneten DMF den DRF anderer Arbeiten durch Bildung des Reziproken gegenüberstellt (Tab. 23), fallen die ermittelten DMF vergleichsweise gering aus. Die an Patienten gewonnenen Daten wurden auf einen

durchschnittlichen Menschen (Körpergewicht von 70 kg, Gabe von 500 mg Amifostin absolut, Tab. 22) bezogen und die In-vitro-Ergebnisse (Tab. 19) wurden auf mg/kg umgerechnet. Bei Yuhas und Storer [116] wurden Dosisreduktionsfaktoren (DRF) an Mäusen gewonnen. Der Endpunkt der Untersuchungen war zum einen als hämatopoetische Letalität bei 50% in 30 Tagen (LD50/30) und zum anderen als Entstehung von Hautulzera bei 50% der Mäuse (nicht dargestellt) jeweils nach Bestrahlung mit und ohne Amifostin definiert.

Tab. 23: Gegenüberstellung der Daten von Yuhas und Storer [116] an Mäusen bei Ermittlung von DRF der 50%-Letalität in 30 Tagen nach Bestrahlung bei verschiedenen Amifostinkonzentrationen und eigenen Daten (* in vivo: Initialschäden Tab. 22; °in vitro: Initialschäden Tab. 18). Die eigenen Daten wurden auf mg/kg umgerechnet, um eine Vergleichbarkeit der DMF zu ermöglichen.

Amifostindosis bei der Maus in mg/kg	DRF-Reziproke entspricht dem DMF	Amifostindosis bei dem Menschen in mg/kg bei 70 kg	DMF
		7*	0,86
100	0,63		
250	0,45	250°	0,84
350	0,41		
500	0,38	500°	0,84
		1000°	0,85
		2500°	0,88
		5000°	0,79

Die deutlich geringeren DMF bei Messung mit dem Comet Assay können in den unterschiedlichen Endpunkten (LD50/30 gegenüber % DNS im Schweif) der Experimente begründet sein. Beim Comet Assay mißt man primär nicht den Zelltod (apoptotische und nekrotische Fraktionen sind zwar differenzierbar) sondern die prozentuale Ausprägung eines DNS-Schadens. Zum Beispiel könnte im oberen Meßbereich bei % DNS im Schweif der Übergang zwischen Zellüberleben und Zellabsterben im Comet Assay relativ klein sein. Dieser schmale Grad (nekrotische Zellen ab 80 % DNS im Schweif) würde sich bei isolierter Betrachtung der Frage nach dem Überleben numerisch ganz anders ausprägen. Des weiteren sind humane Einzelzellen nicht unbedingt mit dem Ansprechen des Organismus einer Maus vergleichbar, da gewebespezifischen Interaktionen nicht berücksichtigt werden können.

Auch Vergleiche der DMF mit Protektionsfaktoren bei Bestimmung der **Überlebensfraktion** sind nicht lege artis, da hier die Reaktion einer Zellgruppe mit der qualitativen Frage der Letalität dem prozentualen DNS-Schaden einzelner Zellen (quantitativ) gegenübergestellt wird. Bei Bestimmung der Überlebensfraktion nach Bestrahlung mit 7,5 Gy von ovariellen chinesischen Hamsterzellen (CHO-AA8) ermittelten Grdina et al. [37,39] bei Konzentrationen von 1 bis 4 mmol Protektionsfaktoren von 3 bis 6, entsprechend einem DMF von 0,33 bis 0,16 ohne Sättigung der Radioprotektion in diesem Konzentrationsbereich. Bei chinesischen Hamsterzellen (V79-171) wurde dagegen eine Sättigung der Radioprotektion durch intrazelluläres WR-1065 bei Messung der Überlebensfraktion gesehen [19].

Bei 700-fach höherer Konzentration in vitro (Tab. 23), änderte sich die Dosismodifikation der Initialschäden von 0,86 in vivo (Patienten) nur geringgradig auf 0,79 (Proband 1). Diese Form der Dosismodifikation kann einer Sättigung der radioprotektiven Wirkung entsprechen. Eine andere Erklärung dafür könnte der begrenzte Meßbereich (in % DNS im Schweif) beim Comet Assay sein. In summa betrug die Dosismodifikation durch Amifostin bei quantitativer Schadensmessung im Comet Assay 10-20 %. Im Vergleich dazu wurden in einer großen Studie an Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren nach radiotherapeutischer Behandlung mit Amifostin Verbesserungen der Xerostomie unter Bestrahlung bei 22 % und bei chronischer Xerostomie nach einem Jahr bei 23 % gesehen [16]. Insgesamt profitierten von 100 Patienten unter Radioprotektorgabe 22 Patienten. Daraus wird deutlich, daß der Comet Assay auch bei klinisch geringen Änderungen der Strahlenempfindlichkeit entsprechende Radiosensitivitätsverschiebungen detektieren kann.

Die **Basalschäden** (unbestrahlte Proben mit bzw. ohne Amifostin) wurden separat betrachtet, weil Amifostin nicht nur als Radioprotektivum, sondern auch wegen zytoprotektiver Eigenschaften bei alleinigen Chemotherapien eingesetzt wird und somit Effekte unabhängig von der Bestrahlung im Comet Assay meßbar sein könnten [36]. Inkonstant war bei den In-vivo-Experimenten ein verminderter Basalschaden nach 0 und 10 min Reparatur zu verzeichnen. Ob dieses Phänomen artifiziell oder durch einen schon vorbestehenden DNS-Schaden (Größenordnung von 1-2% DNS im Schweif) verursacht ist, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Nach 60 min Reparatur war der Unterschied ausgeglichen. Ursachen für vorbestehende DNS-Schäden wurden schon unter 2.3.1 und 4.1.4 beschrieben.

Ein konstant vorhandener zusätzlicher reparaturturverstärkender Effekt war in vitro nicht zu verzeichnen. In der ersten (exponentiellen) Phase der **Reparatur** war die Strahlenschutzwirkung durch Amifostin teilweise vernachlässigbar. Nach 60 und 120 min spiegelte sich die Höhe der Initialschadensunterschiede in den Residualschadensdifferenzen bei den meisten Experimenten wider, partiell war eine höhere Radioprotektion (DMF) als nach 0 min vorhanden. Außerdem führte die Verzehnfachung der Amifostinkonzentration (250-500 µg/ml im Vergleich zu 2500-5000 µg/ml, Tab. 20) nach 60 min zu einer signifikanten Reparaturverbesserung, die aber nach 120 min nicht mehr detektierbar war. Insgesamt erweiterte sich dadurch der Dosismodifikationsbereich in der Reparatur nicht wesentlich.

Es bleibt offen, ob die Bestimmung einer Überlebensfraktion (qualitative Schadensbestimmung) oder der Comet Assay (quantitative Schadensgraduierung) geeigneter ist, die Radioprotektion abzuschätzen. Gegen die Protektionsfaktoren, die durch Ermittlung der Überlebensfraktion berechnet wurden, spricht, daß hohe Einzeiddosen selten bei kurativer Zielsetzung appliziert werden und dadurch die Höhe des Protektionsfaktors für teilweise unrealistische Energiedosen (bis 40 Gy) errechnet wurde. Aus den Diagrammen von Calabro-Jones et al. [19] ist nach 2 Gy (konventionelle Einzeldosis) ebenfalls nur ein geringer Überlebensvorteil bei ansteigenden Amifostinkonzentrationen dargestellt.

Durch die beschriebenen vielseitigen **Wirkungen** von Amifostin bietet sich diese Substanz als Zytoprotektor bei Radio- und Chemotherapie an [58]. Bei Plattenepithelkarzinomen im HNO-Bereich wurden in der größten multizentrischen Studie mit WR-2721 signifikant frühe und späte Xerostomie verhindert [16]. Bei Rektumkarzinompatienten konnte mit Amifostin eine bessere Verträglichkeit der Radiochemotherapie bezüglich Diarrhoe und Strahlenerythem verzeichnet werden [30,51]. Ein anderes potentielles Einsatzgebiet ist der Schutz vor renalen Toxizitäten bei Zytostatikagabe, da die Niere bei der Substanzaufnahme die höchsten Amifostinkonzentrationen aufweist [109].

Eine meßbare **Tumorprotektion** an den bisher untersuchten Tumoren (vor allem aus dem Kopf-Hals-Bereich) durch Amifostin wurde in randomisierten klinischen Studien nicht verzeichnet [58]. Im Tierversuch (Mäuse) war das Normalgewebe abgesehen vom Gehirn stärker als der Tumor geschützt [109]. Wenn im Ergebnis weiterer klinischer Forschung eine Festlegung der Tumorkontrolldosis unter Amifostin für die einzelnen Tumorentitäten erfolgt ist, kann eine dort eventuell vorhandene Tumorprotektion durch **Energiedosiseskalation** ausgeglichen werden und bestehende argumentative Kritikpunkte auflösen. Selbst bei geringer Tumorprotektion sollte durch die Energiedosiserhöhung die gleiche Tumorkontrolle bei reduzierten Nebenwirkungen erreicht werden. Dieses Vorgehen würde eine Anwendung der Parallelverschiebung der therapeutischen Breite (Tumorkontrolle und Komplikationsrisiko in Abhängigkeit von der Strahlendosis bei unterschiedlicher Radioprotektion) bedeuten.

Ob die Dosismodifikation durch Amifostin dazu führt, daß mehr subletal geschädigte Zellen überleben, welche Ausgangspunkt von Zweitmalignomen sein könnten oder ob gerade die Induktion von NF κ B die **Zweitmalignombildung** verhindert, soll Gegenstand weiterer Studien sein [37].

In der vorliegenden Arbeit ist die Reproduzierbarkeit des Verfahrens als auch die Meßbarkeit von Radioprotektion nachgewiesen worden. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die intraindividuelle Variabilität zu verschiedenen Zeitpunkten gering und zum gleichen Zeitpunkt (3.1) nicht signifikant ist. Da die Heterogenität einer Population auch in dieser Arbeit ersichtlich war - durch unterschiedliche DMF in vitro und in vivo - ergeben sich für den Einsatz des Verfahrens intra- und interindividuelle Folgerungen und weitergehende Diskussionspunkte.

Die Idee, prädiktive Assays zu entwickeln, ergab sich aus dem Vorhandensein eines geringen Prozentsatzes (1-5 %) von extremem Ansprechen auf Bestrahlung in Form von Hautulzeration und -desquamation, Fibrosierungen und anderen Nebenwirkungen mit teilweise letalem Ausgang. Wenn die Radiosensitivität wie eine Gaussfunktion verteilt ist, gäbe es neben den extrem Reagierenden („Überreagierern“) einen entsprechenden Anteil radioresistenter Personen [17]. Zur Verhinderung tödlicher Ereignisse bei radiotherapeutisch zu Behandelnden könnte ein Test, der die Position des Patienten im Radiosensitivitätsspektrum erfaßt, zur Energiedosisanpassung an die individuelle oder intrinsische Radiosensitivität genutzt werden. Vor Anwendung eines prädiktiven Tests in der Strahlentherapie sollten unter anderem folgende Fragen beantwortet werden [73]:

1. Welche DNS-Schädigungen (Doppelstrangbruch, Mehrfachschäden u.a.) führen zum Zelltod und welche zu einem Residualschaden mit Einbau permanenter Mutationen, die für Spätnebenwirkungen (Fibrose, Zweitneoplasie u.a.) verantwortlich sind?
2. Mit welchem Gewebe oder welchen Zellpopulationen kann man die Nebenwirkung am sogenannten „Normalgewebe“ vorhersagen, beziehungsweise was ist Normalgewebe?

Ad 1.) Der falsch oder nicht reparierte **Doppelstrangbruch** wird für den Zelltod nach Bestrahlung verantwortlich gemacht. Es bleibt die Frage, welche Konstellation von zwei Einzelstrangbrüchen eine Zelle als Doppelstrangbruch erkennt und entsprechend aufwendig repariert [73]: Sind es zwei genau gegenüberliegende, oder bis 20 Basen voneinander entfernte, oder gar um 100 Nukleotide distanzierte Einzelstrangbrüche? Je nach Verfahren wird ein Doppelstrangbruch wie zwei Einzelstrangbrüche (langsame Reparaturphase des alkalischen Comet Assays) gemessen. Oder zwei in vivo als Einzelstrangbrüche erkannte Läsionen (da sie weit genug voneinander entfernt sind) werden methodisch bedingt als Doppelstrangbruch gemessen (schnelle Rejoiningphase beim neutralen Comet Assay) [73]. Hierbei spielt wie schon unter 4.1.7 beschrieben der Kondensierungsgrad der DNS eine Rolle. Die Identifizierung der Läsion, die als realer Doppelstrangbruch in vivo repariert wird, ist noch Gegenstand aktueller Forschung.

Die **Qualität der Reparatur** kann zum Beispiel mit dem Micronukleus-Test (Verursachung von Mikronukleusformationen durch un- oder falschverbundene Doppelstrangbrüche) abgeschätzt werden [59,97]. Von Streffer [106] wurde die Kombination von Mikronukleus-Test (Reparaturqualität) und Comet Assay (Information zu Initialschaden, Residualschaden und Reparaturkinetik) vorgeschlagen. Es existieren weitere Verfahren zur Messung der Qualität der Reparatur, die in einer Übersichtsarbeit von Olive [73] näher erläutert sind.

Ad 2.) Zur Frage des Normalgewebes gibt es bei den am intensivsten untersuchten Populationen (Lymphozyten, Fibroblasten, epidermale Zellen) sowohl Korrelation als auch fehlende Korrelation mit Früh- oder Spätnebenwirkung einer Bestrahlung [18,29,70,80,106,112,119 u.a.m.]. Aus dieser Vielschichtigkeit ist bisher kein eindeutiger Schluß ableitbar. Am besten wäre es, wenn immer das Gewebe, an welchem die Nebenwirkung auftritt, zur Untersuchung herangezogen würde, wobei der Einfluß beispielsweise von Endothelien bisher wegen der schlechteren Verfügbarkeit (Präparation von Kapillaren) wenig untersucht wurde.

Zur Umgehung der beiden bisher nur ansatzweise beantworteten Fragen kann die Nutzung prädiktiver Tests im Sinne von Vorher-Nachher-Vergleichen dienen, da es bei intraindividuellen Tests nur um Veränderungen der Radiosensitivität eines Probanden oder Patienten bei verschiedenen Bedingungen (Pharmakazusatz wie Zytostatika, Radiosensitizer, Radioprotektoren u.a.) geht. Auf die Schwierigkeit eines Eichmaßes zur Definition der Radiosensitivität von normalem Gewebe kann dabei verzichtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage der Radioprotektion von Amifostin an Blutzellen und isolierten Lymphozyten deshalb immer als Paarvergleich geführt.

Der Comet Assay ist geeignet, auch kleine Änderungen in der Strahlenempfindlichkeit (10-20 % durch Amifostin) sicher und reproduzierbar zu detektieren. Die beschriebene Methodik kann zur Messung von Einflüssen auf die Radiosensitivität bei intraindividuellen Fragestellungen empfohlen werden. Bei interindividuellen Untersuchungen ist das Spektrum der Radiosensitivität des Normalgewebes möglicherweise zu groß und könnte geringgradige Modulierungen der Strahlenempfindlichkeit nivellieren. Die relativ schnelle Durchführbarkeit des Verfahrens (pro Experiment zwei Tage), einfache Gewinnung von Untersuchungsmaterial, sowie die geringe benötigte Zellanzahl, als auch die relativ niedrigen Kosten (keine radioaktiven Marker) zeigen die Möglichkeit einer Integration des Tests in die klinische Routinediagnostik auf.

Zu prüfen, welchen Einfluß unterschiedliche Reparaturkinetiken oder unterschiedlich hohe Initial- und Residualschäden auf den lebenden Organismus insgesamt haben, bleibt klinischen Studien vorbehalten. In vitro kann die prinzipielle Richtung der Reaktion (Radioprotektion, Radiosensibilisierung, Häufigkeit von Zelltod oder Überleben je nach Zytostatikum oder Fraktionierungsschema der Radiatio) vorhergesagt werden, so daß In-vitro-Assays klinische Bedeutung bei der Substanzauswahl und Bestrahlungsplanung (Fraktionierung) für eine individualisierte Therapie gewinnen können.

Aus den Ergebnissen sind zwei Kernaussagen ableitbar:

1. Die Reproduzierbarkeit des Methodik ist gewährleistet.
2. Radioprotektion ist mit dem Comet Assay meßbar.

Diese Hauptaussagen beruhen auf folgenden zuführenden Argumenten und Meßergebnissen:

Bei den Untersuchungen zur **Reproduzierbarkeit** des Comet Assays konnte sowohl für die Induktion von Initialschäden nach Bestrahlung, als auch für ihre Reparatur nach 10 und 60 min die Wiederholbarkeit der Messungen jeweils an mehreren Präparaten demonstriert werden. Die Blutproben stammten vom gleichen Spender und wurden am selben Tag entnommen und präpariert. Bei Wiederholung der Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten - mit gleichem Experimentdesign und Spendern - zeigte sich eine sichere Reproduzierbarkeit mindestens bis zu einem Zeitfenster von vier Wochen (abgesehen von einer Probe auch bis zu drei Monaten). Bei der Auswertung der Präparate war die Schadenszunahme unter Bestrahlung sowohl visuell als auch durch computergestützte Messungen nachvollziehbar. Der Meßparameter DNS im Schweif [%] war für den Energiedosisbereich (0 bis 8 Gy) der geeigneteste Parameter, da die Sättigungscharakteristik der Schweiflänge nicht mit einfließt (wie beim Kometenmoment). Unterschiedliche Agaroselösungsmittel (PBS, RPMI) veränderten das Wanderungsverhalten der DNS, so daß Untersuchungen nur bei Verwendung derselben Agaroseaufbereitung vergleichbar waren. Bei den Messungen zur Radiosensitivität von Gesamtblut und isolierten Lymphozyten wiesen die isolierten Lymphozyten gleiche Initialschäden, aber höhere Basalschäden (separationsbedingter Artefakt) und eine kleinere Reparaturkapazität mit erhöhtem Residualschaden gegenüber dem Gesamtblut auf, so daß zur Vergleichbarkeit von Experimenten gleiche Zellarten verwendet werden sollten.

Die Untersuchungen zur **Radioprotektion** durch Amifostin ergaben folgende Resultate: Das Prodrug Amifostin selbst vermittelt keine radioprotektiven Effekte. Auch die alleinige Zugabe von alkalischer Phosphatase hat keinen Einfluß auf die Strahlenempfindlichkeit isolierter Lymphozyten. Erst nach der Aktivierung von Amifostin ist ein Strahlenschutz meßbar. Um 100 µg/ml Amifostin zu aktivieren, waren 1 U/ml alkalische Phosphatase in vitro bei isolierten Lymphozyten nötig. Bei Verwendung von 0,5 U/ml alkalischer Phosphatase war kein radioprotektiver Effekt mehr nachweisbar. Die Aktivierung von Amifostin erfolgt mit großer Geschwindigkeit, so daß die Inkubationszeit (0, 15, 30 min) keinen Einfluß auf den detektierbaren Strahlenschutz hatte.

Die berechneten dosismodifizierenden Faktoren waren sowohl bei Applikation des Pharmakons in vitro als auch nach In-vivo-Gabe probanden- bzw. patientenspezifisch aber unabhängig von der Höhe der Energiedosis. Der DMF ließ sich bei höheren Amifostinkonzentrationen in vitro (5000 µg/ml) nur geringgradig beeinflussen (0,87 in vivo nach 500 mg intravenös versus 0,80 in vitro; durchschnittliche DMF der Initialschäden). Eine konstant vorhandene zusätzliche DNS-Schadensabnahme bei den amifostinhaltigen Proben während der Reparatur war nicht zu verzeichnen. In der ersten (exponentiellen) Phase der Reparatur war die Strahlenschutzwirkung durch Amifostin teilweise vernachlässigbar. Nach 60 und 120 min spiegelte sich die Höhe der Initialschadensunterschiede in den Residualschadensdifferenzen bei den meisten Experimenten wider, partiell war eine höhere Radioprotektion (DMF) als nach 0 min vorhanden.

Die Enzymausstattung verschiedener Gewebe mit alkalischer Phosphatase, die bisher als einer von mehreren Selektionsmechanismen zur vorrangigen Wirkung von Amifostin an Normalgewebe angesehen wird, ist kritisch zu hinterfragen, da wahrscheinlich schon die Enzymvorkommen in Endothel und Serum zur Aktivierung zu WR-1065 ausreichen. Die **klinische Konsequenz** wäre ein breiteres Einsatzgebiet von Amifostin unabhängig von der Enzymkonzentration des Tumorgewebes, da andere Selektionsmechanismen wie die Verteilung von Polyamintransportern oder der pH-abhängige Ladungszustand des Amifostinmoleküls biologische Priorität gewinnen.

Schlußfolgerung:

Der Comet Assay ist geeignet, um Radioprotektion zu detektieren. Die beschriebene Methodik weist eine hohe Reproduzierbarkeit auf und kann zur Messung von Einflüssen auf die Radiosensitivität bei intraindividuellen Fragestellungen empfohlen werden. Bei interindividuellen Untersuchungen ist das Spektrum der Radiosensitivität des Normalgewebes möglicherweise zu groß und könnte geringgradige Modulierungen der Strahlenempfindlichkeit nivellieren.

Die relativ schnelle Durchführbarkeit des Verfahrens (pro Experiment zwei Tage) und einfache Gewinnung von Untersuchungsmaterial zeigen die Möglichkeit einer Integration des Tests in die klinische Routinediagnostik auf. Weitere Einsatzfelder wären zum einen die Messung der Radiosensitivität von Tumor- und Normalgewebe zur Prädiktion von Wirkung sowie Nebenwirkung und zum anderen die Untersuchung der Effektivität verschiedener Zytostatika an den jeweiligen Tumorzellen zur Vereinfachung der Auswahl des geeignetesten Chemotherapeutikums während der Strahlentherapie. Die Evaluierung dieser prädiktiven Einsatzgebiete ist noch Gegenstand aktueller Forschung.

- [1] Adam J, Deutschmann C, Enke H, Haerting J, Lautenschläger C, Wortha H-P: Einführung in die medizinische Biometrie. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 1992, S. 102-105
- [2] Akifev AP, Khudolii GA, Iakimenko AV, Krasnopevtsev AV, Khandogina EK: [The G1-process in human lymphocytes cultured with PHA, and formation of radiation-induced chromosome aberrations]. *Genetika* 31 (1995) 485-491
- [3] Alapetite C, Thirion P, de la Rochefordiere A, Cosset JM, Moustacchi E: Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. *Int J Cancer* 83 (1999) 83-90
- [4] Anderson D, Dobrzynska MM, Basaran N, Basaran A, Yu TW: Flavonoids modulate comet assay responses to food mutagens in human lymphocytes and sperm. *Mutat Res* 402 (1998) 269-277
- [5] Anderson D, Plewa MJ: The International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 13 (1998) 67-73
- [6] Aschner B: Paracelsus sämtliche Werke. Verlag von Gustav Fischer, Jena, 1926, S. 477
- [7] Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, Browne MA: The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. *Mutagenesis* 10 (1995) 85-90
- [8] Bache M, Pigorsch S, Dunst J, Wurl P, Meye A, Bartel F, Schmidt H, Rath FW, Taubert H: Loss of G2/M arrest correlates with radiosensitization in two human sarcoma cell lines with mutant p53. *Int J Cancer* 96 (2001) 110-117
- [9] Banath JP, Wallace SS, Thompson J, Olive PL: Radiation-induced DNA base damage detected in individual aerobic and hypoxic cells with endonuclease III and formamidopyrimidine-glycosylase. *Radiat Res* 151 (1999) 550-558

- [10] Bauch T: Messung von DNA-Schäden und -Reparatur in Einzelzellen. Dissertation, Fachbereich Bio- und Geowissenschaften, Universität-Gesamthochschule Essen (1996) 34-36
- [11] Bauer E, Recknagel RD, Fiedler U, Wollweber L, Bock C, Greulich KO: The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (χ^2) not a gaussian distribution. *Mutat Res* 398 (1998) 101-110
- [12] Blasiak J, Kowalik J: A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutat Res* 469 (2000) 135-145
- [13] Blasiak J, Trzeciak A, Dziki A, Ulanska J, Pander B: Synergistic effect of vitamin C on DNA damage induced by cadmium. *Gen Physiol Biophys* 19 (2000) 373-379
- [14] Boyum A: Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol Suppl* 5 (1976) 9-15
- [15] Böcker W, Bauch T, Müller WU, Streffer C: Image analysis of comet assay measurements. *Int J Radiat Biol* 72 (1997) 449-460
- [16] Brizel DM, Wasserman TH, Henke M, Strnad V, Rudat V, Monnier A, Eschwege F, Zhang J, Russell L, Oster W, Sauer R: Phase III randomized trial of amifostine as a radioprotector in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 18 (2000) 3339-3345
- [17] Burnet NG, Johansen J, Turesson I, Nyman J, Peacock JH: Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. Steering Committee of the BioMed2 European Union Concerted Action Programme on the Development of Predictive Tests of Normal Tissue Response to Radiation Therapy. *Int J Cancer* 79 (1998) 606-613
- [18] Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH: Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet* 339 (1992) 1570-1571
- [19] Calabro-Jones PM, Aguilera JA, Ward JF, Fahey RC: The limits to radioprotection of Chinese hamster V79 cells by WR-1065 under aerobic conditions. *Radiat Res* 149 (1998) 550-559

- [20] Calabro-Jones PM, Aguilera JA, Ward JF, Smoluk GD, Fahey RC: Uptake of WR-2721 derivatives by cells in culture: identification of the transported form of the drug. *Cancer Res* 48 (1988) 3634-3640
- [21] Calabro-Jones PM, Fahey RC, Smoluk GD, Ward JF: Alkaline phosphatase promotes radioprotection and accumulation of WR-1065 in V79-171 cells incubated in medium containing WR-2721. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 47 (1985) 23-27
- [22] Chapman JD, Stobbe CC, Gales T, Das IJ, Zellmer DL, Biade S, Matsumoto Y: Condensed chromatin and cell inactivation by single-hit kinetics. *Radiat Res* 151 (1999) 433-441
- [23] Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslova K, Vaughan N: Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen* 30 (1997) 139-146
- [24] Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R: The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 375 (1997) 183-193
- [25] Cook PR, Brazell IA: Conformational constraints in nuclear DNA. *J Cell Sci* 22 (1976) 287-302
- [26] Cotellet S, Ferard JF: Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ Mol Mutagen* 34 (1999) 246-255
- [27] Dhawan A, Mathur N, Seth PK: The effect of smoking and eating habits on DNA damage in Indian population as measured in the Comet assay. *Mutat Res* 474 (2001) 121-128
- [28] Dunn T: Oxygen and cancer. *N C Med J* 58 (1997) 140-143
- [29] Dunst J, Gebhart E, Neubauer S: [Can an extremely elevated radiosensitivity in patients be recognized by the in-vitro testing of lymphocytes?]. *Strahlenther Onkol* 171 (1995) 581-586

- [30] Dunst J, Semlin S, Pigorsch S, Müller AC, Reese T: Intermittent use of amifostine during postoperative radiochemotherapy and acute toxicity in rectal cancer patients. *Strahlenther Onkol* 176 (2000) 416-421
- [31] Duthie SJ, Johnson W, Dobson VL: The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells. *Mutat Res* 390 (1997) 141-151
- [32] Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL: The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339 (1995) 37-59
- [33] Fucic A: [The comet assay method: a new approach in genotoxicology research]. *Arh Hig Rada Toksikol* 48 (1997) 413-419
- [34] Gedik CM, Ewen SW, Collins AR: Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat Biol* 62 (1992) 313-320
- [35] Gibbs JH, Potts RC, Brown RA, Robertson AJ, Beck JS: Mechanisms of phytohaemagglutinin (PHA) stimulation of normal human lymphocytes: 'trigger' 'push' or both? *Cell Tissue Kinet* 15 (1982) 131-137
- [36] Glover D, Glick JH, Weiler C, Fox K, Turrisi A, Kligerman MM: Phase I/II trials of WR-2721 and cis-platinum. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12 (1986) 1509-1512
- [37] Grdina DJ, Murley JS, Kataoka Y: Radioprotectants: current status and new directions. *Oncology* 63 Suppl 2 (2002) 2-10
- [38] Grdina DJ, Murley JS, Kataoka Y, Epperly W: Relationships between cytoprotection and mutation prevention by WR-1065. *Mil Med* 167 (2002) 51-53
- [39] Grdina DJ, Shigematsu N, Dale P, Newton GL, Aguilera JA, Fahey RC: Thiol and disulfide metabolites of the radiation protector and potential chemopreventive agent WR-2721 are linked to both its anti-cytotoxic and anti-mutagenic mechanisms of action. *Carcinogenesis* 16 (1995) 767-774
- [40] Green MH, Lowe JE, Waugh AP, Aldridge KE, Cole J, Arlett CF: Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. *Mutat Res* 316 (1994) 91-102

- [41] Hartmann A, Plappert U, Raddatz K, Grunert-Fuchs M, Speit G: Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis* 9 (1994) 269-272
- [42] Hellman B, Vaghef H, Bostrom B: The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 336 (1995) 123-131
- [43] Herrmann T, Baumann M: *Klinische Strahlenbiologie*. 3. völlig überarbeitete Aufl., Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm, 1997, S. 30-33
- [44] Hooper NM: Glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane enzymes. *Clin Chim Acta* 266 (1997) 3-12
- [45] Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W: Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 374 (1997) 261-268
- [46] Kasyapa CS, Ramanadham M: Alkaline phosphatase activity is expressed only in B lymphocytes committed to proliferation. *Immunol Lett* 31 (1992) 111-116
- [47] Kataoka Y, Murley JS, Khodarev NN, Weichselbaum RR, Grdina DJ: Activation of the nuclear transcription factor kappaB (NFkappaB) and differential gene expression in U87 glioma cells after exposure to the cytoprotector amifostine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53 (2002) 180-189
- [48] Kauffmann G, Moser E, Sauer R: *Radiologie*. 2. Aufl. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 2001, S. 33-56
- [49] Kent CR, Eady JJ, Ross GM, Steel GG: The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay. *Int J Radiat Biol* 67 (1995) 655-660
- [50] Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G: The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 363 (1996) 89-96
- [51] Kligerman MM, Liu T, Liu Y, Scheffler B, He S, Zhang Z: Interim analysis of a randomized trial of radiation therapy of rectal cancer with/without WR-2721. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22 (1992) 799-802
- [52] Korst AE, Eeltink CM, Vermorken JB, van der Vijgh WJ: Pharmacokinetics of amifostine and its metabolites in patients. *Eur J Cancer* 33 (1997) 1425-1429

- [53] Kozinets GI, Kotelnikov VM, Poljanskaja AM, Goldberg VE, Gusejnov TN: Proliferation patterns of peripheral blood lymphocytes in CLL patients: cytophotometric and microfluorimetric study. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 114 (1987) 97-110
- [54] Lankinen MH, Vilpo LM, Vilpo JA: UV- and gamma-irradiation-induced DNA single-strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes. *Mutat Res* 352 (1996) 31-38
- [55] Li N, Oberley TD: Modulation of antioxidant enzymes, reactive oxygen species, and glutathione levels in manganese superoxide dismutase-overexpressing NIH/3T3 fibroblasts during the cell cycle. *J Cell Physiol* 177 (1998) 148-160
- [56] Li N, Zhai Y, Oberley TD: Two distinct mechanisms for inhibition of cell growth in human prostate carcinoma cells with antioxidant enzyme imbalance. *Free Radic Biol Med* 26 (1999) 1554-1568
- [57] Löwe S: Persönliche Mitteilung. (1998)
- [58] Mabro M, Faivre S, Raymond E: A risk-benefit assessment of amifostine in cytoprotection. *Drug Saf* 21 (1999) 367-387
- [59] Mariya Y, Streffer C, Fuhrmann C, Wojcik A: Correlation of radiation-induced micronucleus frequency with clonogenic survival in cells of one diploid and two tetraploid murine tumor cell lines of the same origin. *Radiat Res* 147 (1997) 29-34
- [60] McCarthy PJ, Sweetman SF, McKenna PG, McKelvey-Martin VJ: Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. *Mutagenesis* 12 (1997) 209-214
- [61] McDonald DM, Baluk P: Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res* 62 (2002) 5381-5385
- [62] McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A: The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res* 288 (1993) 47-63

- [63] Mendiola-Cruz MT, Morales-Ramirez P: Repair kinetics of gamma-ray induced DNA damage determined by the single cell gel electrophoresis assay in murine leukocytes in vivo. *Mutat Res* 433 (1999) 45-52
- [64] Metz G: Amifostin, ein neues Zytoprotektivum. *Pharmazeutische Zeitung, Sonderdruck* 26 (1997) 32-39
- [65] Monroe JG, Kass MJ: Molecular events in B cell activation. I. Signals required to stimulate G0 to G1 transition of resting B lymphocytes. *J Immunol* 135 (1985) 1674-1682
- [66] Moss DW: Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chem* 28 (1982) 2007-2016
- [67] Moss DW: Release of membrane-bound enzymes from cells and the generation of isoforms. *Clin Chim Acta* 226 (1994) 131-142
- [68] Nascimento PA, da Silva MA, Oliveira EM, Suzuki MF, Okazaki K: Evaluation of radioinduced damage and repair capacity in blood lymphocytes of breast cancer patients. *Braz J Med Biol Res* 34 (2001) 165-176
- [69] Newton GL, Aguilera JA, Kim T, Ward JF, Fahey RC: Transport of aminothiols radioprotectors into mammalian cells: passive diffusion versus mediated uptake. *Radiat Res* 146 (1996) 206-215
- [70] Nunez MI, Guerrero MR, Lopez E, del Moral MR, Valenzuela MT, Siles E, Villalobos M, Pedraza V, Peacock JH, Ruiz de Almodovar JM: DNA damage and prediction of radiation response in lymphocytes and epidermal skin human cells. *Int J Cancer* 76 (1998) 354-361
- [71] O'Neill KL, Fairbairn DW, Standing MD: Analysis of single-cell gel electrophoresis using laser-scanning microscopy. *Mutat Res* 319 (1993) 129-134
- [72] Oberley TD, Oberley LW: Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol* 12 (1997) 525-535
- [73] Olive PL: The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat Res* 150 (1998) S42-S51

- [74] Olive PL, Banath JP, Durand RE: Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res* 122 (1990) 86-94
- [75] Olive PL, Frazer G, Banath JP: Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat Res* 136 (1993) 130-136
- [76] Olive PL, Wlodek D, Banath JP: DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res* 51 (1991) 4671-4676
- [77] Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Banath JP: Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp Cell Res* 198 (1992) 259-267
- [78] Östling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123 (1984) 291-298
- [79] Östling O, Johanson KJ, Blomquist E, Hagelqvist E: DNA damage in clinical radiation therapy studied by microelectrophoresis in single tumour cells. A preliminary report. *Acta Oncol* 26 (1987) 45-48
- [80] Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, Owen R, Regan J, Yarnold J: Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiother Oncol* 55 (2000) 173-178
- [81] Peters GJ, van der Vijgh WJ: Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine (WR-2721): preclinical aspects. *Eur J Cancer* 31A Suppl 1 (1995) S1-S7
- [82] Pigorsch S: Untersuchungen zur Radiosensitivität mit dem Comet Assay. Dissertation, Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. (2001)
- [83] Rasey JS, Spence AM, Badger CC, Krohn KA, Vera DM, Livesey JC: Specific protection of different normal tissues. *Pharmacol Ther* 39 (1988) 33-43
- [84] Rieth A: Ethyol, Produktmonographie, Zytoprotektivum zur Optimierung der Tumortherapie, Essex Pharma. (1996)

- [85] Roberts NJ, Jr.: Variability of results of lymphocyte transformation assays in normal human volunteers. Responses of mononuclear leukocytes to mitogen stimulation. *Am J Clin Pathol* 73 (1980) 160-164
- [86] Rojas E, Lopez MC, Valverde M: Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 722 (1999) 225-254
- [87] Romanul FCA, Bannister RG: Localized areas of high alkaline phosphatase activity in endothelium of arteries. *Nature* 195 (1962) 611-612
- [88] Ronzon F, Desbat B, Chauvet JP, Roux B: Behavior of a GPI-anchored protein in phospholipid monolayers at the air-water interface. *Biochim Biophys Acta* 1560 (2002) 1-13
- [89] Rydberg B, Johanson KJ: Estimation of single strand breaks in mammalian cells. In: Hannawalt PC, Friedberg EC, Fox CF (Hrsg): *DNA Repair Mechanisms*. Academic Press, New York, 1978, S. 465-468
- [90] Sachs L: *Angewandte Statistik*. 7. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1992, S. 575
- [91] Schnurstein A, Braunbeck T: Tail moment versus tail length-application of an in vitro version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 49 (2001) 187-196
- [92] Schonau E, Herzog KH, Bohles HJ: [Determination of the isoenzymes of alkaline phosphatase in serum and tissue homogenates with HPLC]. *Monatsschr Kinderheilkd* 135 (1987) 632-636
- [93] Shaw LM, Bonner H, Lieberman R: Pharmacokinetic profile of amifostine. *Semin Oncol* 23 (1996) 18-22
- [94] Shaw LM, Bonner HS, Brown DQ: Metabolic pathways of WR-2721 (ethiol, amifostine) in the BALB/c mouse. *Drug Metab Dispos* 22 (1994) 895-902

- [95] Shaw LM, Glover D, Turrisi A, Brown DQ, Bonner HS, Norfleet AL, Weiler C, Glick JH, Kligerman MM: Pharmacokinetics of WR-2721. *Pharmacol Ther* 39 (1988) 195-201
- [96] Shaw LM, Turrisi AT, Glover DJ, Bonner HS, Norfleet AL, Weiler C, Kligerman MM: Human pharmacokinetics of WR-2721. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12 (1986) 1501-1504
- [97] Shibamoto Y, Shibata T, Miyatake S, Oda Y, Manabe T, Ohshio G, Yagi K, Streffer C, Takahashi M, Abe M: Assessment of the proliferative activity and radiosensitivity of human tumours using the cytokinesis-block micronucleus assay. *Br J Cancer* 70 (1994) 67-71
- [98] Singh NP: Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res* 455 (2000) 111-127
- [99] Singh NP, Danner DB, Tice RR, Brant L, Schneider EL: DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat Res* 237 (1990) 123-130
- [100] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175 (1988) 184-191
- [101] Singh NP, Stephens RE, Schneider EL: Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int J Radiat Biol* 66 (1994) 23-28
- [102] Singh NP, Tice RR, Stephens RE, Schneider EL: A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutat Res* 252 (1991) 289-296
- [103] Smoluk GD, Fahey RC, Calabro-Jones PM, Aguilera JA, Ward JF: Radioprotection of cells in culture by WR-2721 and derivatives: form of the drug responsible for protection. *Cancer Res* 48 (1988) 3641-3647
- [104] Souid AK, Fahey RC, Dubowy RL, Newton GL, Bernstein ML: WR-2721 (amifostine) infusion in patients with Ewing's sarcoma receiving ifosfamide and cyclophosphamide with mesna: drug and thiol levels in plasma and blood cells, a Pediatric Oncology Group study. *Cancer Chemother Pharmacol* 44 (1999) 498-504

- [105] Spencer CM, Goa KL: Amifostine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential as a radioprotector and cytotoxic chemoprotector. *Drugs* 50 (1995) 1001-1031
- [106] Streffer C: [Genetic predisposition and radiation sensitivity of normal tissue]. *Strahlenther Onkol* 173 (1997) 462-468
- [107] Stryer L: *Biochemie*. 2. korr. Nachdruck Spektrum akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994, S. 84
- [108] Thomas L: *Labor und Diagnose*. 4. überarbeitete und erweiterte Aufl. Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg, 1992, S. 63
- [109] Utley JF, Seaver N, Newton GL, Fahey RC: Pharmacokinetics of WR-1065 in mouse tissue following treatment with WR-2721. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10 (1984) 1525-1528
- [110] Vijayalaxmi, Tice RR, Strauss GH: Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res* 271 (1992) 243-252
- [111] Ward JF: Biochemistry of DNA lesions. *Radiat Res Suppl* 8 (1985) S103-S111
- [112] West CM: Invited review: intrinsic radiosensitivity as a predictor of patient response to radiotherapy. *Br J Radiol* 68 (1995) 827-837
- [113] Willers H, Beck-Bornholdt HP: Origins of radiotherapy and radiobiology: separation of the influence of dose per fraction and overall treatment time on normal tissue damage by Reisner and Miescher in the 1930s. *Radiother Oncol* 38 (1996) 171-173
- [114] Yuhas JM: Differential protection of normal and malignant tissues against the cytotoxic effects of mechlorethamine. *Cancer Treat Rep* 63 (1979) 971-976
- [115] Yuhas JM: Active versus passive absorption kinetics as the basis for selective protection of normal tissues by S-2-(3-aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid. *Cancer Res* 40 (1980) 1519-1524
- [116] Yuhas JM, Storer JB: Differential chemoprotection of normal and malignant tissues. *J Natl Cancer Inst* 42 (1969) 331-335

- [117] Zheng S, Newton GL, Gonick G, Fahey RC, Ward JF: Radioprotection of DNA by thiols: relationship between the net charge on a thiol and its ability to protect DNA. *Radiat Res* 114 (1988) 11-27
- [118] Zheng S, Newton GL, Ward JF, Fahey RC: Aerobic radioprotection of pBR322 by thiols: effect of thiol net charge upon scavenging of hydroxyl radicals and repair of DNA radicals. *Radiat Res* 130 (1992) 183-193
- [119] Zhou PK, Sproston AR, Marples B, West CM, Margison GP, Hendry JH: The radiosensitivity of human fibroblast cell lines correlates with residual levels of DNA double-strand breaks. *Radiother Oncol* 47 (1998) 271-276

7 Anlagen

7.1 **Material**

7.1.1 Zellgewinnung

PBS-Dulbecco, Ca⁺⁺/Mg⁺⁺, SEROMED, BIOCHROM KG (Ch.-Nr. 593U)

Percoll (Dichte: 1,077 g/cm³) SEROMED, BIOCHROM KG (Ch.-Nr. 152U)

7.1.2 Zellanzahlbestimmung

Trypan Blue (0,5 %), SEROMED, BIOCHROM KG (Ch.-Nr. 444U)

7.1.3 Bestrahlung

Kupferfilter (0,5 mm), PHILIPS

Tubus (15x20x40 cm), PHILIPS

Piacryl-Platten (20x30x0,5 cm), WERKSTATT STRAHLENTHERAPIE,
eine Piacryl-Platte enthält Aussparungen für 5 Objektträger

7.1.4 Comet Assay

a) PBS-Lösung

PBS (Phosphate Buffered Saline) Dulbecco's, Ca⁺⁺/Mg⁺⁺-frei, GIBCO BRL (Ch.-Nr. 3011070 und 3027714)

b) RPMI-Lösung

RPMI 1640 mit 25mM Hepes und L-Glutamin, BIOWHITTAKER EUROPE
(Ch.-Nr. 9MB0058)

c) Agarosen

1 g Agarose (1 %), GIBCO BRL, (Ch.-Nr. 66G1371 und 65G1359) ad 100 ml PBS

0,6 g Agarose (0,6 %), GIBCO BRL, (Ch.-Nr. 66G1371 und 65G1359) ad 100 ml PBS

0,5 g Low-Melting-Point(LMP)-Agarose (0,5 %), GIBCO BRL, (Ch.-Nr. 97D1664) ad 100 ml PBS-Lösung (ohne Reparatur) bzw. mit 10 ml Fetales Kälberserum (FKS) ad 100 ml RPMI-Lösung (mit Reparatur)

d) Reparaturmedium

15 ml FKS, C.C.PRO (Ch.-Nr. H367) ad 100 ml RPMI-Lösung

e) EDTA-Lösung

14,89 g EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid; Disodium Salt: Dihydrate), SIGMA (Ch.-Nr. 87H0089 und 29H001715) ad 200ml Aqua dest.

f) 10M Natriumhydroxid-Lösung

400 g Natriumhydroxid Plätzchen, MERCK (Ch.-Nr. B210798814) ad 1000 ml Aqua dest.

g) Lysis-Lösung

Die Lysis-Stammlösung wurde monatlich erneuert und die daraus bereitete Lysis-Gebrauchslösung jeweils frisch hergestellt.

h) Lysis-Stammlösung

146,1 g Natriumchlorid, MERCK (Ch.-Nr. K26646404 928 und K26811304 952)

37,2 g EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid; Disodium Salt: Dihydrate), SIGMA (Ch.-Nr. 87H0089 und 29H001715)

1,2 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, MERCK (Ch.-Nr. K26037782 919 und K26836782 942)

7,5 g Natriumhydroxid Plätzchen, MERCK (Ch.-Nr. B210798814)
ad 890 ml Aqua dest.

Nach Auflösung der Substanzen in Aqua dest. wurde mit 10M Natriumhydroxidlösung (NaOH) der pH-Wert 10 eingestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Natrium-Laurylsarcosinat (N-Laurylsarcosine).

10 g Natrium-Laurylsarcosinat(N-Laurylsarcosine), SIGMA (Ch.-Nr. 38H0149)

i) Lysis-Gebrauchslösung

2,5 ml Triton X-100, SIGMA (Ch.-Nr. 28H2536)

25 ml Dimethylsulfoxid (DMSO), MERCK (Ch.-Nr. K26174152923)

ad 250 ml Lysis-Stammlösung

Die Lysis-Gebrauchslösung wurde auf drei Küvetten portioniert und auf 4-8 °C im Kühlschrank temperiert.

j) Elektrophorese-Lösung

58 ml 10M Natriumhydroxidlösung (NaOH)

10ml EDTA-Lösung

ad 2000ml Aqua dest.

Der pH-Wert der Elektrophorese-Lösung betrug 13,3.

k) Neutralisations-Lösung

48,5 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, MERCK (Ch.Nr. K26037782 919 und K26836782 942)

Mit 1M Salzsäure wurde der pH-Wert von 7,5 eingestellt:

49 ml Titrisol Salzsäure(1M HCl), MERCK (Ch.Nr. 70266970 und 80289926)

ad 1000ml Aqua dest.

l) Fluoreszenzfarbstoff-Lösung

20 µl Ethidiumbromid (Ethidium Bromide), SIGMA (Ch.Nr. 55H6772)

ad 10ml Aqua dest.

m) Amifostin

5 mg oder 10 mg Ethiol (Amifostin), ESSEX PHARMA (Ch.Nr. 97K0917K), steril portioniert von der Universitätsapotheke Halle

n) Alkalische Phosphatase

Alkaline Phosphatase (pH 7,6); 0,1ml entsprechen 2000 Units, 1 Unit hydrolysiert 1 µmol/min bei pH 9,8 und 37 °C, SIGMA (Ch.Nr. 115H7060)

o) pH-Messung

Technischer Einheitspuffer (TEP) pH 7 bei 25 °C, WTW WEILHEIM (Ch.Nr. 05.02-8)

Technischer Einheitspuffer (TEP) pH 10 bei 25 °C, WTW WEILHEIM (Ch.Nr. 02.01-2)

Kaliumchlorid-Lösung (3M KCl), MERCK (Ch.Nr. 60195718)

p) Computergestützte Auswertung

Komet 3.1, KINETIC IMAGING

SPSS 10.0 für Windows, SPSS INC.

7.1.5 Verbrauchsmaterial

Deckgläschen, 24x60 mm, MENZEL,
EDTA-Monovette (5 ml), SARSTEDT,
Färbeküvetten, KARTELL,
Gewebekulturröhrchen Zellstar (10 ml), GREINER LABORTECHNIK, steril,
Objektträger (fully frosted slides) 3"x1", 1,2 mm dick, LABCRAFT, BRAND,
Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 50, OSRAM,
Röhrchen (1 und 2 ml), EPPENDORF,
Röhrchen (15 ml), CORNING,
Sixwells, HERAEUS,
Zellkulturflaschen (50 ml), NALGE NUNC INTERNATIONAL, steril, gewinkelt,
Zitrat-Monovette (5 ml), SARSTEDT,

7.2 Geräte

Brutschrank IG 150, JOUAN,
Brutschrank, MEMMERT,
Computer (133 MHz, 8MB), AMD mit 2 Monitoren 4v/ADI, MICROSCAN,
Eis- und Kühlschrankskombination DKK 172, FORON,
Elektrophoresegerät Phero-Stab 550, BIOTEC FISCHER,
Elektrophoresekammer, BIOTEC FISCHER,
Auflichtfluoreszenzmikroskop Axioskop, ZEISS (JENA),
Mikroskop-Kamera MC80, ZEISS (JENA),
Hämatologie-System Sysmex K1000, DIGITANA,
Heizplatte, ROMMELSBACHER,
Laminarbox TC 72, GELAIRE FLOW LABORATORIES,
Mikroskop, ZEISS (JENA), mit Lichtquelle Typ 515A/y von PGH RUNDFUNK-
FERNSEHEN,
Präparatekammer, WERKSTATT STRAHLENTHERAPIE,
Röntgentiefentherapieanlage RT 250, PHILIPS,
Temperiertes Wasserbad, Typ 1083, GFL,
Zentrifuge Universal 16R Typ 1602, HETTICH

1. Zur Optimierung der Strahlentherapie zählt neben einer Verbesserung der Tumorkontrolle auch eine Reduzierung von Nebenwirkungen. In den letzten Jahrzehnten wurden In-vitro-Assays etabliert, um die Radiosensitivität von Tumor- und Normalgewebe prätherapeutisch erkennen zu können. In dieser Arbeit wurde der Comet Assay bezüglich der Validität und Praktikabilität untersucht. Mit der Messung der Strahlenempfindlichkeit von Einzelzellen (Gesamtblut und isolierte Lymphozyten) ist pro Experiment ein vertretbarer zeitlicher Aufwand (2 Tage) verbunden.
2. Die Reproduzierbarkeit des Comet Assays ist sowohl für die Induktion von Initialschäden nach Bestrahlung, als auch für ihre Reparatur nach 10 und 60 min gewährleistet.
3. Die Wiederholbarkeit der Experimente zu unterschiedlichen Zeitpunkten ist mindestens bis zu einem Experimentabstand von vier Wochen gegeben.
4. Die Schadenzunahme unter Bestrahlung ist sowohl visuell als auch durch computergestützte Messungen nachvollziehbar.
5. Unterschiedliche Agaroselösungsmittel (PBS, RPMI) verändern das Wanderungsverhalten der DNS, so daß Untersuchungen nur bei Verwendung derselben Agaroseaufbereitung vergleichbar sind.
6. Bei der Untersuchung der Radiosensitivität von Gesamtblut und isolierten Lymphozyten weisen die isolierten Lymphozyten gleiche Initialschäden, aber höhere Basalschäden (separationsbedingter Artefakt) und eine kleinere Reparaturkapazität mit erhöhtem Residualschaden gegenüber dem Gesamtblut auf, so daß zur Vergleichbarkeit von Experimenten gleiche Zellarten verwendet werden sollten.
7. Das Verfahren wurde zur Determinierung des Einflusses von Amifostin auf die Strahlenempfindlichkeit auf zellulärer Ebene eingesetzt. Das Prodrug Amifostin selbst vermittelt keine radioprotektiven Effekte. Auch die alleinige Zugabe von alkalischer Phosphatase hat keinen Einfluß auf die Radiosensitivität isolierter Lymphozyten.
8. Um 100 µg/ml Amifostin zu aktivieren, waren 1 U/ml alkalische Phosphatase in vitro bei isolierten Lymphozyten nötig. Bei Verwendung von 0,5 U/ml alkalischer Phosphatase war in vitro kein radioprotektiver Effekt mehr nachweisbar, so daß sich für In-vitro-Bedingungen eine Mindestkonzentration mit einem Schwellenbereich von 0,5-1 U/ml alkalische Phosphatase ableiten ließe.

9. Die Aktivierung von Amifostin erfolgt mit großer Geschwindigkeit, so daß die Inkubationszeit (0, 15, 30 min) keinen Einfluß auf den detektierbaren Strahlenschutz hatte.
10. Die berechneten dosismodifizierenden Faktoren (DMF) waren sowohl bei Applikation der Substanz in vitro als nach In-vivo-Gabe probanden- bzw. patientenspezifisch aber unabhängig von der Höhe der Energiedosis. Der DMF ließ sich bei höheren Amifostinkonzentrationen in vitro nur geringgradig steigern.
11. Die durchschnittliche Radioprotektion mit Amifostin (Dosismodifikation) betrug in vitro 0,80 (5000 µg/ml) und in vivo 0,87 (500 mg absolut), so daß eine Dosismodifikation von 10-20 % mit dem Comet Assay detektierbar war.
12. Eine konstant vorhandene zusätzliche DNS-Schadensabnahme bei den amifostinhaltigen Proben während der Reparatur war nicht zu verzeichnen. In der ersten (exponentiellen) Phase der Reparatur war die Strahlenschutzwirkung durch Amifostin teilweise vernachlässigbar. Nach 60 und 120 min spiegelte sich die Höhe der Initialschadensunterschiede in den Residualschadensdifferenzen bei den meisten Experimenten wider, partiell war eine höhere Radioprotektion (DMF) als nach 0 min vorhanden.
13. Ob die Enzymausstattung verschiedener Gewebe mit alkalischer Phosphatase in vivo ein entscheidender Selektionsfaktor zur vorrangigen Wirkung von Amifostin an Normalgewebe darstellt, ist mit den vorliegenden In-vitro-Resultaten kritisch zu hinterfragen, da schon die Enzymvorkommen von Endothel und Serum zur Aktivierung zu WR-1065 ausreichen könnten.
14. Der Meßparameter DNS im Schweif [%] war für den verwandten Energiedosisbereich (0 bis 8 Gy) der geeigneteste Parameter, da die Sättigungscharakteristik der Schweiflänge nicht mit einfließt (wie beim Kometenmoment).
15. **Schlußfolgerung:** Der Comet Assay ist geeignet, Radioprotektion zu detektieren. Die beschriebene Methodik weist eine hohe Reproduzierbarkeit auf und kann zur Messung von Einflüssen auf die Radiosensitivität bei intraindividuellen Fragestellungen empfohlen werden. Bei interindividuellen Untersuchungen ist das Spektrum der Radiosensitivität des Normalgewebes möglicherweise zu groß und könnte geringgradige Modulierungen der Strahlenempfindlichkeit nivellieren.

Lebenslauf

Name: Arndt-Christian Müller

Geburtsdatum: 18.02.1975

Geburtsort: Merseburg

Familienstand: Ledig

Religion: Evangelisch

Schulbildung / Zivildienst:

- 1981-1983 Besuch der Polytechnischen Oberschule "Dr. Theodor Neubauer",
1983-1990 Schüler in der Chorklasse der Polytechnischen Oberschule
"August Hermann Francke", Mitglied des Stadtsingechores zu Halle,
1990-1993 Erweiterte Oberschule "Adolf Reichwein", seit 1991 Gymnasium
"Adolf Reichwein", Abitur 1993 (Note: 1,1),
1993-1994 Zivildienst (Tätigkeit in der Inneren Medizin)

Hochschulstudium:

- 1994-2001 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg,
1996 Physikum,
1998 Erstes Staatsexamen,
2000 Zweites Staatsexamen,
2001 Drittes Staatsexamen (Note: 1,83; 18.07.2003 Approbation)

Beruflicher Werdegang:

- 2002/2003 Arzt im Praktikum/Assistenzarzt an der Klinik für Strahlentherapie der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bis heute

Praktika / Tätigkeiten:

- 3-4/1999 Famulatur im Department of Radiation Oncology im Massachusetts
General Hospital in Boston,
6/1999-6/2002 Aufsichtsratsmitglied der SEG-Med. eG
4/2000 Gründungsmitglied des Leo-Clubs Halle an der Saale, aktuell Past-Präsident
10/2000-2/2001 Klinik für Innere Medizin Spital Zimmerberg, Lehrkrankenhaus der
Universität Zürich, Praktisches Jahr
7/2002 Intensivkurs „Grundlagen der Säugerzell- und Gewebekultur und aktuelle
Aspekte der Stammzellforschung“, IPK Gatersleben, Prof. Dr. A. Wobus

Selbständigkeitserklärung

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

Halle/Saale, den 25. September 2003

Arndt-Christian Müller

Publikationsliste

1. Dunst J, Semlin S, Pigorsch S, Müller AC, Reese T: Intermittent use of amifostine during postoperative radiochemotherapy and acute toxicity in rectal cancer patients. *Strahlenther Onkol* 176 (2000) 416-421
2. Müller AC, Pigorsch S, Dunst J: Radioprotection by Amifostine measured with Comet Assay. *Strahlentherapie und Onkologie* 175 (1) (1999) 60
3. Müller AC, Pigorsch S, Beyer C, Lautenschläger S, Dunst J: Radioprotective effects of amifostine in vivo and in vitro measured with the comet assay.
Eingereicht bei Strahlentherapie und Onkologie am 07.08.2003
4. Pigorsch S, Müller AC, Gerlach R, Dunst J: Untersuchungen zur Strahlensensibilität mit dem Comet Assay bei zwei Patienten im Verlauf einer Ganzkörperbestrahlung. Abstractband, Ermatingen Wolfsberg, Schweiz (1999) 67

Erklärung

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

Halle/Saale, den 25. September 2003

Arndt-Christian Müller

Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. Jürgen Dunst für die Überlassung der sowohl klinischen als auch experimentellen Thematik. Die Beratung und Betreuung in allen Phasen der Dissertation war sehr anregend und richtungsweisend. Durch die Ermöglichung von Praktika im In- und Ausland konnte ich mich weiter in die Problematik vertiefen und wertvolle Erfahrungen sammeln.

Frau C. Perl und Frau B. Rühlmann danke ich für die hilfreiche Labororganisation. Für die fachlichen Gespräche und die kollegiale Zusammenarbeit im Labor danke ich besonders Frau Dr. med. S. Pigorsch. Unterstützung bei der Einarbeitung in die Methodik des Comet Assays erfuhr ich von Herrn S. Löwe.

Die technische Absicherung des Verfahrens übernahm Herr Dr. rer. nat. R. Gerlach. Die konstruktive Kommunikation mit ihm kam mir vor allem bei der Standardisierung des Verfahrens zu Gute.

Herr Dr. med. habil. C. Beyer beriet mich bei der Durchführung der Lymphozytenseparation im Institut für Klinische Chemie in sehr entgegenkommender Weise. Maßgeblich unterstützte mich Frau Dr. C. Lautenschläger bei der statistischen Auswertung. Die Experimente mit Amifostin waren nur durch eine gute Zusammenarbeit mit Herrn DM T. Reese, den Schwestern der Station 1 und der Kliniksapotheke möglich.

Meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Verlobten danke ich sehr herzlich für das wohlthuende Verständnis und die bereichernden Gespräche.