

Aus der Klinik für Strahlendiagnostik

Geschäftsführender Direktor:
Prof. Dr. med. Klaus Jochen Klose

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum
Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

**Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen
bei computertomographischen
Untersuchungen
– Einfluss von Kontrastmittelgabe**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Caroline Pathe
aus Schleiz
Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität

Marburg am: 27.06.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Johannes T. Heverhagen

1. Korreferent: PD Dr. Michl

INHALTSVERZEICHNIS

Titelblatt i

Zweite Seite ii

Inhaltsverzeichnis 1 – 5

1. Einleitung 6 – 21

1.1 Natürliche und medizinische Strahlenexposition 6

1.2 Röntgenstrahlung und ihre klinische Anwendung
in der Computertomographie 6

1.2.1 Geschichte und Entstehung von Röntgenstrahlung ... 7

1.2.1.1 Charakteristische Strahlung 7

1.2.1.2 Bremsstrahlung 8

1.2.1.3 Prinzip einer Röntgenröhre 8

1.2.2 Geschichte und Prinzip der Computertomographie ... 8

1.2.2.1 Geschichte der Computertomographie 8

1.2.2.2 Prinzip der Computertomographie 9

1.2.2.3 Computertomographie mit
Kontrastmittelapplikation 10

1.2.2.3.1 Klinische Nebenwirkungen von Kontrastmitteln 11

1.2.2.3.2 Auswirkungen von Kontrastmittelapplikation
auf die DNA 12

1.3	Wechselwirkung von Röntgenstrahlung mit Materie	13
1.3.1	Der Photoeffekt	13
1.3.2	Der Comptoneffekt	14
1.3.3	Die Paarbildung	14
1.4	Auswirkungen von Röntgenstrahlung auf die DNA ...	15
1.4.1	DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs)	16
1.4.2	Reparaturmechanismen von DSBs	16
1.4.2.1	Die zelluläre Erkennung von DSBs	17
1.4.2.2	Nichthomologes Endjoining (NHEJ)	18
1.4.2.3	Homologe Rekombination (HR)	18
1.5	Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen	19
1.5.1	γ H2AX	20
1.5.2	Die γ H2AX-Methode zur Quantifizierung von DSBs	21

2. Zielsetzung 22 - 23

2	Zielsetzung	22
---	-------------------	----

3. Material und Methoden 24 - 31

3.1	Material	24
3.1.1	Geräte	24
3.1.2	Chemikalien	25
3.1.3	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	26
3.1.4	Blutentnahme	26

3.1.5	Sonstige Materialien	27
3.2	Patientenuntersuchung	27
3.2.1	Studienprotokoll	27
3.2.2	Einverständnis	27
3.2.3	Ein- und Ausschlusskriterien	28
3.2.4	Patientenkollektiv	28
3.2.5	Blutentnahme	28
3.2.6	Zeitlicher Ablauf der Untersuchungen	29
3.3	Methoden	29
3.3.1	Computertomographie	29
3.3.2	Isolierung und Fixierung der Lymphozyten	30
3.3.3	Immunfluoreszenzfärbung	31
3.3.4	Fluoreszenzmikroskopie	31

4. Ergebnisse 32 - 45

4.1	Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen in vivo nach Computertomographie mittels γ -H2AX-Foci	32
4.1.1	Patientenmerkmale und Focizahlen	32
4.1.2	Focizahlen aller Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Computertomographieuntersuchung	36
4.2	Untersuchung des Kontrastmitteleffektes in vivo nach Computertomographie	38
4.2.1	Aufteilung der Patienten in zwei Gruppen	38

4.2.2	Merkmale von Gruppe I	38
4.2.3	Merkmale von Gruppe II	39
4.2.4	Anzahl der Doppelstrangbrüche im Zeitverlauf von Patienten ohne Kontrastmittelapplikation	39
4.2.5	Anzahl der Doppelstrangbrüche im Zeitverlauf von Patienten mit Kontrastmittelapplikation	40
4.2.6	Vergleich von Gruppe I und II bezüglich der Kinetik der Doppelstrangbrüche	42
4.2.6.1	Ergebnisse nach Subtraktion des Hintergrundfocuslevels	44

5. Diskussion 46 - 58

5.1	Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Computertomographie mittels der γ -H2AX-Methode	46
5.1.1	Die γ -H2AX-Methode als valides Verfahren zur Bestimmung von Doppelstrangbrüchen in vivo	47
5.1.2	Die Induktion von Doppelstrangbrüchen nach Computertomographie	48
5.1.3	Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen nach Computertomographie	49
5.2	Auswirkung von Kontrastmittel auf die Entstehung von Doppelstrangbrüchen nach Computertomographie	52
5.3	Auswirkung von Kontrastmittel auf die Reparaturkinetik der Doppelstrangbrüche	54
5.4	Ausblick	56

Literaturverzeichnis	59 - 66
Abkürzungsverzeichnis	67 - 69
Zusammenfassung	70 - 71
Summary	72 - 73
Lebenslauf	74
Verzeichnis der akademischen Lehrer	75
Danksagung	76
Ehrenwörtliche Erklärung	77

1 Einleitung

1.1 Natürliche und medizinische Strahlenexposition

Durchschnittlich 1% aller Zellen des menschlichen Organismus werden jeden Tag von ionisierenden Teilchen und Strahlung, welche aus dem Weltall kommen, getroffen. Zusätzlich sind Menschen der Strahlung radioaktiver Stoffe, die natürlich in der Erdkruste vorkommen, ausgesetzt. Dabei spricht man von der sogenannten „natürlichen Hintergrundstrahlung“. Die Dosis der natürlichen Hintergrundstrahlung auf der Erde beträgt ca. 0,01 mSv pro Tag (Grudzenski 2009).

Neben der natürlichen Hintergrundstrahlung (85%) hat die medizinische Strahlung (14%) den größten Anteil an der Strahlenexposition der Weltbevölkerung. Obwohl Computertomographieuntersuchungen in Deutschland im Jahre 2006 nur etwa 7% aller bildgebenden Verfahren mit ionisierender Strahlung ausmachten, stellen sie mit einem Anteil an der medizinischen Strahlendosis von 60 % (im Jahre 2006) den größten Strahlungsverursacher dar. Zwischen 1996 und 2006 hat sich die Anzahl der CT-Untersuchungen in Deutschland nahezu verdoppelt (Knollmann *et al.* 2006; Bundesamt für Strahlenschutz 2010).

1.2 Röntgenstrahlung und ihre klinische Anwendung in der Computertomographie

Um ein konventionelles Röntgenbild oder ein computertomographisches Bild zu erzeugen, bedarf es Röntgenstrahlung, wobei bei der Computertomographie die Strahlenexposition ca. 1000 mal höher ist als z.B. bei einer Thorax-Röntgenaufnahme (Lobrich *et al.* 2005).

Gegebenheit	Durchschnittlich applizierte Dosis [mSv]
Natürliche Hintergrundstrahlung	Ca. 3/Jahr
Transatlantikflug (Hin- und Zurück)	0,1
Mammographieuntersuchung*	3
Thorax-Computertomographieuntersuchung*	ca. 10
Expositionslimit von Nukleararbeitern (ICRP 1991)	20/Jahr
Atombombenüberlebende (mittlere Dosis in der LSS-Kohorte, Preston 2003)	200

Tab. 1: Angaben der durchschnittlich absorbierten Dosis an ionisierender Strahlung (IR) für verschiedene Gegebenheiten. Da der Strahlungsart-abhängige Wichtungsfaktor w_R für Röntgen- und γ -Strahlung = 1 ist, gilt, dass 1 mSv = 1 mGy. Außer bei den mit * gekennzeichneten medizinischen Untersuchungen, die nur Teilkörperbestrahlungen betreffen, ist eine Ganzkörperdosis angegeben (Grudzenski 2009).

1.2.1 Geschichte und Entstehung von Röntgenstrahlung

Am 8. November 1895 entdeckte Wilhelm Conrad Röntgen die Röntgenstrahlung, als fluoreszenzfähige Gegenstände während des Betriebs einer Kathodenstrahlröhre nahe der Röhre trotz Abdeckung dieser hell zu leuchten begannen. Sein Verdienst ist es, die Bedeutung der neuentdeckten Strahlen früh erkannt und diese als erster wissenschaftlich untersucht zu haben. Bereits sieben Wochen nach seiner Entdeckung reichte er eine Arbeit, „Über eine neue Art von Strahlen“, zur Veröffentlichung ein und erhielt 1901 für seine Forschung den ersten physikalischen Nobelpreis (Vorstand des Röntgen-Kuratorium Würzburg e.V. 2010).

Röntgenstrahlung entsteht, wenn beschleunigte Elektronen auf Materie treffen. Dabei unterscheidet man zwei Prozesse, zum einen die Bildung von „charakteristischer Strahlung“ und zum anderen die Bildung von „Bremsstrahlung“ (Kiefer und Kiefer 2003).

1.2.1.1 Charakteristische Strahlung

Treffen beschleunigte Elektronen mit ausreichend hoher Energie auf absorbierende Materie, dann werden Hüllelektronen aus der Atomhülle der in der Materie befindlichen Atome gelöst. Dadurch kommt es zu einem freien Platz in der entsprechenden

Atomschale. Die freigewordenen Plätze in den Schalen werden durch andere Elektronen aufgefüllt, die Energiedifferenz wird als Strahlungsquant abgegeben und charakteristische Röntgenstrahlung entsteht (Kiefer und Kiefer 2003).

1.2.1.2 Bremsstrahlung

Bei der Entstehung von „Bremsstrahlung“ handelt es sich dagegen um einen Prozess, bei dem das beschleunigte Elektron nach dem Coulombschen Gesetz vom positiv geladenen Atomkern angezogen wird. Dadurch wird die Elektronenbahn um den Kern gekrümmt und das Elektron gebremst, wodurch es Energie abgibt. Die dabei abgegebene Energie kann sehr variabel sein und ist abhängig von der ursprünglichen Elektronenenergie und dem Abstand zum Kern. Das Emissionsspektrum einer Röntgenröhre setzt sich aus „charakteristischer Röntgenstrahlung“ und „Bremsstrahlung“ zusammen (Kiefer und Kiefer 2003).

1.2.1.3 Prinzip einer Röntgenröhre

Beide Effekte werden in der Röntgenröhre ausgenutzt, wobei der Wirkungsgrad bemerkenswert gering ist. Nur etwa 1% der aufgewendeten Energie wird in Röntgenstrahlen umgesetzt, der Rest ist Wärme. Eine Röntgenröhre besteht aus einer Kathode in Form einer Glühwendel, die durch eine Heizspannung von ca. 20 V auf ungefähr 2000°C erhitzt wird. Aufgrund ihrer thermischen Energie treten Elektronen aus. Diese werden durch die zwischen Kathode und Anode anliegende Hochspannung beschleunigt und treffen anschließend auf die Anode, in der sie stark abgebremst werden. Hierbei entsteht Röntgenstrahlung (Kiefer und Kiefer 2003).

1.2.2 Geschichte und Prinzip der Computertomographie

1.2.2.1 Geschichte der Computertomographie

Seit der Entdeckung der Röntgenstrahlen gilt die Erfindung der Computertomographie als größte Innovation der Radiologie. 1917 entwickelte der Mathematiker Johann Radon ein nach ihm benanntes mathematisches Verfahren, das als sogenannte Radon-

transformation zur mathematischen Grundlage der Berechnung von räumlichen Aufnahmen eines Objektes mit seinen Innenstrukturen wurde (Prokop *et al.* 2003; Biba 2006). Im Zuge der Verbesserung der Computertechnologie Ende der sechziger Jahre und unter Einbeziehung der Vorarbeiten des Physikers Allan McLeod Cormack zwischen 1957 und 1963 entwickelte der Elektrotechniker Godfrey Hounsfield die ersten Computertomographen. Sein erster klinischer Computertomograph zur Untersuchung des Kopfes kam 1971 im Atkinson-Morley's Hospital in Wimbledon, England, zum Einsatz. 1974 wurde der erste Ganzkörpercomputertomograph errichtet und noch vor dem Ende der 70er Jahre war die grundlegende Evolution der Computertomographie vollzogen. 1979 wurden Godfrey Hounsfield und Allan McLeod Cormack als Väter der Computertomographie mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt. In den 80er Jahren wurden technische Details verfeinert und zu Beginn der 90er Jahre kam es mit Einführung des Spiral-CTs zu einer rasanten Weiterentwicklung, die eine verbesserte diagnostische Leistung, 3D-Bildgebung und CT-Angiographie ermöglichte. Die neueste Innovation ist das Mehrschicht-CT aus dem Jahre 1998, das eine enorme Leistungssteigerung sowie neue Untersuchungsmöglichkeiten erlaubt (Prokop *et al.* 2003). Im Jahr 2000 waren weltweit ca. 30 000 klinische Spiral-CTs installiert (Lehnertz 2010).

1.2.2.2 *Prinzip der Computertomographie*

Die Computertomographie (CT) ist ein Schnittbildverfahren, das mit Röntgenstrahlen arbeitet. Das Bild wird per Computer berechnet. Ein Computertomograph besteht aus der Scaneinheit, die sogenannte Gantry, die u.a. aus der Röntgen- und Detektoreinheit besteht. Der Röntgenstrahler und das gegenüberliegende Bildaufnahmesystem, die Detektoren, rotieren während der Untersuchung gleichsinnig um den Patienten - im Unterschied zum klassischen Röntgen, bei dem die Bilder aus nur einer Richtung angefertigt werden. Der Körper wird in Schichten eingeteilt. Ein Schichtbild setzt sich aus Pixeln (Bildpunkten) zusammen. Jedes Pixel repräsentiert ein Voxel, welches ein Volumenelement von der Größe des Pixels, multipliziert mit der Schichtdicke, ist. Ein dünner Röntgenstrahl tastet den Patienten aus verschiedenen Richtungen ab. Durch Kollimation wird nur eine definierte Scanebene durchstrahlt. Die Detektoren erfassen die Intensität der durch das Gewebe abgeschwächten Strahlung. Die Schwächung eines jeden Voxels entlang eines Strahls wird anschließend mathematisch mittels Radon-

transformation transformiert und in die Bildebene durch gefilterte Rückprojektion zurückprojiziert. Das Ergebnis der Transformation ist eine lokale Röntgenschwächung an jedem Punkt der Untersuchungsschicht. Diese lokalen Röntgenschwächungswerte werden in CT-Werte umgerechnet, die wiederum in Graustufen kodiert und als Bild dargestellt werden. Diese CT-Werte nennt man Hounsfield-Einheit (HE). Sie ist das Maß für die Dichte des Gewebes, errechnet sich aus dem Schwächungskoeffizienten und wird in Relation zu Wasser angegeben. Dabei entspricht Wasser einer HE von 0 und Luft einer HE von -1000 (Prokop *et al.* 2003; Siemens AG 2006; Schäfer und Klose 2008).

1.2.2.3 Computertomographie mit Kontrastmittelapplikation

Heute ist die Computertomographie eine der wichtigsten Methoden der radiologischen Diagnostik. Sie liefert überlagerungsfreie Querschnittsbilder des Körpers und zeigt niedrigere Kontrastunterschiede als herkömmliche Röntgenbilder. Überlegen ist die Computertomographie der Projektionsradiographie z.B. bei komplexen Lagebeziehungen und immer dann, wenn kleine, weichteildichte Strukturen zu beurteilen sind (Schäfer und Klose 2008; Siemens AG 2006).

Die Aussagekraft einer Computertomographie-Aufnahme lässt sich durch Kontrastmittel (KM) erheblich steigern. Aus diesem Grund werden bei manchen Fragestellungen zusätzlich vor der Bestrahlung Kontrastmittel injiziert.

Röntgenkontrastmittel gelten nach § 2 Abs. 1 Nr. 2 des deutschen Arzneimittelgesetzes als Arzneimittel. Es handelt sich um Substanzen, die in den Körper eingebracht werden, um entweder als sog. positive Kontrastmittel zu einer vermehrten Absorption eintretender Röntgenstrahlen gegenüber dem umgebenden Gewebe zu führen oder, im Falle von negativen Kontrastmitteln, gering oder gar nicht absorbiert zu werden.

Röntgenpositive KM enthalten Elemente mit hoher Ordnungszahl (Z), die höher als die des umliegenden Gewebes ist (z.B. Barium $Z = 56$ oder Jod $Z = 53$). Sie können in wasserlösliche und wasserunlösliche KM unterteilt werden. Nicht wasserlösliche röntgenpositive KM dienen der besseren Darstellung der Speiseröhre und des Magen-Darm-Traktes (z.B. bariumsulfathaltige Lösungen) oder werden als ölige Jodverbindungen bei Lymphographien eingesetzt. Röntgenpositive wasserlösliche KM sind Salze der Trijod-

Benzoessäure und werden intravaskulär appliziert. Sie dienen zur Darstellung der Nieren, ableitenden Harnwege (Urographie), anderer Organe oder der Angiographie.

Röntgennegative Kontrastmittel sind CO₂, Luft und wässrige Medien und werden beispielsweise zur Kontrastdarstellung des Ösophagus oder des Magen-Darm-Traktes simultan mit einem positiven Kontrastmittel angewendet (Schäfer und Klose 2008).

Jodhaltige Kontrastmittel sind mit 40 bis 50 Millionen Anwendungen pro Jahr die weltweit am häufigsten intravaskulär verwendeten Arzneimittel, die zwecks medizinisch bildgebender Verfahren appliziert werden (Christiansen *et al.* 2000). Sie reichern sich an bestimmten Stellen des Körpers an und modifizieren die Absorption der Röntgenstrahlung so, dass dadurch zusätzliche Informationen morphologischer und funktionseller Natur gewonnen werden können. Orte mit höherer Konzentration an KM und damit höherer mittlerer Ordnungszahl (Z) absorbieren die Strahlung stärker und erscheinen somit auf dem CT-Bild heller als Orte mit niedrigerer Konzentration an KM und damit kleinerem mittlerem Z (Elke und Schmitt 1992). Die Helligkeitsänderungen auf dem Computertomographiebild und die Kontrastmittel- und damit Jodkonzentration, verhalten sich direkt linear zueinander (Clement *et al.* 2002).

1.2.2.3.1 Klinische Nebenwirkungen von Kontrastmitteln

Jodhaltige Kontrastmittel werden weltweit als eine der sichersten und am weitesten verbreiteten injizierbaren Medikamente angesehen. Ungeachtet dessen können Nebenwirkungen auftreten, die von geringen Beeinträchtigungen, wie Wärmegefühl während der Injektion des Kontrastmittels oder bitterer Geschmack im Mund, bis zu potentiell letalen Komplikationen reichen können (Kopp *et al.* 2008). Bekannte, wenn auch seltene, Nebenwirkungen von KM sind die Belastung des Herz-Kreislaufsystems aufgrund hoher Osmolalität und damit Einstrom physiologischer Gewebsflüssigkeit in das Gefäßsystem, allergische Unverträglichkeitsreaktionen, die von Juckreiz bis zum anaphylaktischen Schock reichen können, jodinduzierte Hyperthyreose sowie die KM-induzierte Nephropathie (Kuefner *et al.* 2008).

Kontrastmittel werden im Körper nicht weiter metabolisiert und sind entweder lebergängig oder werden über die Nieren ausgeschieden (Wild und Puig 2003).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Kontrastmittel war ausschließlich das jodhaltige KM Iopromid (Ultravist®), das in einer Studie von Kopp aus dem Jahre 2008 eine Nebenwirkungsrate von 1,5% aufwies.

1.2.2.3.2 Auswirkungen von Kontrastmittelapplikation auf die DNA

Neben Untersuchungen zu klinischen Nebenwirkungen existieren auch solche über DNA-Schäden nach Gabe von jodhaltigem Kontrastmittel in Kombination mit Röntgenstrahlung. Dabei wurde beobachtet, dass durch Zugabe von Kontrastmittel sowohl *in vitro* (Norman *et al.* 1978; Matsudaira *et al.* 1980; Hadnagy *et al.* 1982; Matsubara *et al.* 1982; Parvez *et al.* 1987; Joubert *et al.* 2005; Grudzenski *et al.* 2009; Jost *et al.* 2009) als auch *in vivo* (Adams *et al.* 1978; Callisen *et al.* 1979; Cochran *et al.* 1980; Stephan und Hadnagy 1981; Matsubara *et al.* 1982; Parvez *et al.* 1987; Mozdarani und Fadaei 1998; Grudzenski *et al.* 2009) bei Röntgenstrahlenexposition DNA-Schäden in Form von Chromosomenaberrationen, vermehrt auftretenden Mikrokernen, erhöhter Anzahl an DNA-Einzelstrangbrüchen sowie DNA-Doppelstrangbrüchen, zunehmen.

Die Ursachen dieser Beobachtungen sind bis heute unklar. Es existieren verschiedene Erklärungsversuche. Callisen *et al.* waren 1979 die Erstbeschreiber der Dosissteigerung durch jodhaltiges KM und präsentierten in ihrem Paper eine quantitative Bewertung dieser auf Basis der Energieabsorption durch Jod und Wasser. Callisen *et al.* sowie Hadnagy *et al.* (1982) und Bodou (2007) sind der Ansicht, dass durch Jod eine Verstärkung des Photoeffektes auftritt und dies der Hauptfaktor der erhöhten DNA-Schädigung durch Anwesenheit von Kontrastmitteln während der Bestrahlung ist. Der Photoeffekt hängt stark von der Ordnungszahl des absorbierenden Stoffes ab. Elemente mit höherer Ordnungszahl wie z.B. Jod absorbieren Strahlung in biologischem Gewebe stärker als Elemente mit niedrigerer Ordnungszahl. Basierend auf dem Photoeffekt wird bei Verwendung von jodhaltigem Kontrastmittel in der Röntgenbildgebung sekundär Strahlung emittiert und Photoelektronen, Röntgenfluoreszenz sowie Auger-Elektronen entstehen. Dieses Phänomen führt nach ihrer Ansicht zu einer erhöhten Energieabsorption in benachbarten Zellen (Jost *et al.* 2009).

Joubert *et al.* (2005) dagegen meinen, dass das Reparaturvermögen der DNA durch die Entstehung chemisch aktiver Kontrastmittel-Spaltprodukte nach Radiolyse beeinträchtigt wird.

Dass Kontrastmittel unabhängig von Strahlung zytotoxische Effekte besitzt, wird von Parvez *et al.* (1987) in Betracht gezogen.

1.3 Wechselwirkung von Röntgenstrahlung mit Materie

Röntgenstrahlung wird zur Photonenstrahlung gezählt. Bei der Interaktion von Photonenstrahlung mit Materie kommt es entweder zur vollständigen Absorption oder zu einer Streuung. Dabei entstehen meist freie, geladene Sekundärteilchen wie Elektronen oder Positronen, die ihrerseits Materie anregen und ionisieren können. Der Photo- sowie der Comptoneffekt zählen zu den Wechselwirkungen, die in der Atomhülle stattfinden. Die Paarbildung dagegen erfolgt mit dem elektrischen Feld des Atomkerns. Im Folgenden werden die verschiedenen Wechselwirkungsprozesse beschrieben (Theis 2008).

1.3.1 Der Photoeffekt

Zum Photoeffekt kommt es vorwiegend, wenn die Quantenenergie der Röntgenstrahlung und die Stärke der Elektronenbindung in etwa gleich sind. Hierbei wird ein Elektron der inneren Schale der Atomhülle durch ein Photon herausgelöst. Dabei wird die gesamte Energie des Photons auf das Elektron übertragen und es verlässt die Atomhülle mit einer kinetischen Energie, die der Differenz der Photonenenergie und der Elektronenbindungsenergie entspricht. Die freigewordene Schale wird nun durch ein Elektron einer kernferneren Schale aufgefüllt. Dadurch kommt es zur Abnahme der potentiellen Energie. Die überschüssige Energie wird in Form von Photonen als charakteristische elektromagnetische Strahlung abgegeben. Der Photoeffekt tritt vor allem bei niedrigeren Photonenenergien von üblicherweise 0,5 kV auf (Hall und Giaccia 2006).

1.3.2 Der Comptoneffekt

Bei hohen Quantenenergien dominiert in erster Linie der Comptoneffekt, der nach seinem Entdecker, dem amerikanischen Physiker Arthur Holly Compton (1892-1962, No-

belpreis 1927), benannt ist. Da die Quantenenergien hierbei beträchtlich größer sind als die Elektronenbindung, wird das Elektron, mit dem das Photon interagiert, als „frei“ betrachtet. Diesmal wird nur ein Teil der Photonenenergie an das Elektron als kinetische Energie abgegeben. Mit der restlichen Energie bewegt sich das Photon weiter auf seiner Bahn, allerdings durch den Zusammenstoß in einem bestimmten Winkel ϕ von seiner Bahn abgelenkt. Anstelle des ursprünglich einfallenden Photons sind nun ein schnelles Elektron und ein in seiner Energie reduziertes Photon vorhanden. Beide können weiterhin mit Materie interagieren und dabei andere Atome ionisieren, chemische Verbindungen aufbrechen und auf diese Weise biologische Schäden verursachen (Kiefer und Kiefer 2003; Hall und Giaccia 2006).

1.3.3 Die Paarbildung

Die Paarbildung spielt nur bei hohen Photonenenergien eine Rolle. Das eingestrahelte Photon interagiert mit dem Kernfeld eines Atoms. Dabei wird das energiereiche Photon absorbiert und spontan ein Elektron-Positron Paar gebildet. Die Bedingung dafür ist, dass die Energie des Photons mindestens die Summe der Ruheenergien der entstandenen Teilchen übersteigt. Die Photonenenergie verteilt sich auf die Ruhemassen der entstandenen Teilchen und der Rest der Energie wird als kinetische Energie auf diese übertragen. Das entstandene Elektron und Positron geben ihre Energie in Form von Stößen an die Materie ab (Kiefer und Kiefer 2003; Theis 2008).

Bei allen drei beschriebenen Prozessen werden Elektronen freigesetzt, deren Energie meist so hoch ist, dass sie noch eine gewisse Wegstrecke in der exponierten Materie zurücklegen können. Dabei lösen sie weitere Ionisationen aus, die die Hauptwirkung von Röntgenstrahlung in Materie darstellen.

1.4 Auswirkungen von Röntgenstrahlung auf die DNA

Trifft Strahlung auf Zellen, dann kommt es entweder zu einer direkten oder indirekten Strahlenwirkung. Die direkte Strahlenwirkung tritt überwiegend bei dicht ionisierender Strahlung, wie z.B. α -Strahlung, auf. Hier hat das Strahlungsteilchen oder ein Sekundärelektron direkt mit der DNA Kontakt und schädigt diese durch Ionisation der DNA-

Basen oder -Zucker. Im Falle der dünn ionisierenden Röntgenstrahlung überwiegt die indirekte Strahlenwirkung. Im Gegensatz zur direkten Strahlenwirkung verursacht diese keine direkten biologischen oder chemischen Schäden. Beim Passieren von Materie kommt es hier zur Wechselwirkung mit anderen Atomen und Molekülen und dabei zur Erzeugung von Radikalen, die über eine Radikalkettenreaktion zu einer DNA-Schädigung führen können. Da die Zelle zu etwa 80% aus Wasser besteht, reagieren die Photonen meist mit Wassermolekülen und dies führt entweder zur Anregung oder zur Ionisation. Durch Anregung können kovalente Bindungen zerbrechen und H[·]- und OH[·]-Radikale entstehen. Im Rahmen der Ionisation der Wassermoleküle kommt es zur Bildung von Wasserradikalkationen (H₂O^{·+}). Alle Radikationen haben eine sehr kurze Lebensdauer von 10⁻¹⁰ Sekunden. Sie zerfallen, um wieder freie Radikale zu bilden. Letztendlich werden an der DNA Radikalstellen gebildet und auf diesem Wege die DNA geschädigt. Es wird angenommen, dass das Hydroxylradikal OH[·] zwei Drittel der durch Photonen erzeugten indirekten DNA-Schäden verursacht. Es führt zur Oxidation der DNA. Zu 70-80% lagert es sich an die Doppelbindungen der Basen an und zu 20-25% kommt es zur H-Abstraktion aus Zuckermolekülen. Über Elektronentransfer können sich die Radikalstellen im DNA-Molekül verlagern. Im Beisein von Luft während der Strahlenexposition werden die DNA-Radikale durch Sauerstoffanlagerung fixiert. Zusätzlich kommt es zur Bildung von Peroxidradikalen und Peroxiden. All diese Radikale sind sehr reaktionsfreudig und führen über weitere chemische Umlagerungen zu chemisch stabilen DNA-Veränderungen. Folgende DNA-Schäden können auftreten: Basenmodifikationen und -verluste, Veränderungen der Zuckermoleküle, Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche, DNA-Vernetzungen (DNA-DNA-Crosslinks), DNA-Protein-Vernetzungen (Crosslinks) sowie Bulky Lesions (Mehrfachereignisse, auch Locally multiply damaged sites, LMDS, genannt).

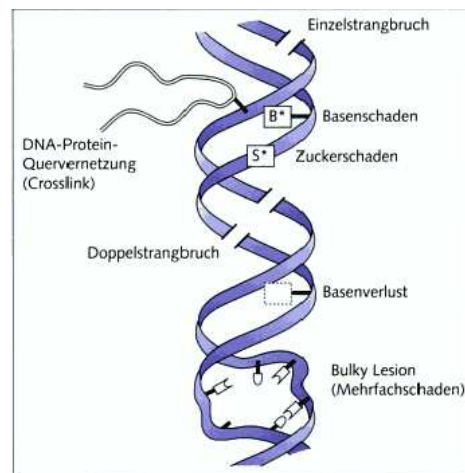


Abb. 1: DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung. (Kauffmann *et al.* 2006)

Nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlung ergeben sich etwa 1000 bis 2000 Basenveränderungen, 500 bis 1000 Einzelstrangbrüche (ESBs), 800 bis 1600 Veränderungen der Zuckermoleküle, 150 DNA-Protein-Quervernetzungen und etwa 50 Doppelstrangbrüche (DSBs) und Bulky Lesions (Kauffmann *et al.* 2006).

1.4.1 DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs)

Doppelstrangbrüche sind die gravierendsten Läsionen der DNA, da hierbei das Zucker-Phosphat-Rückgrat auf beiden DNA-Strängen und damit auch die genetische Information unterbrochen werden (Ward 1995). Werden Doppelstrangbrüche nicht oder fehlerhaft repariert, kann es zur Entstehung von Mutationen und zur malignen Entartung von Zellen kommen (Jeggo und Lobrich 2007; Zhang *et al.* 2007).

1.4.2 Reparaturmechanismen von DSBs

Durch die Schädigung beider DNA-Stränge bei Doppelstrangbrüchen ist die Reparatur diffiziler als im Falle von Einzelstrangbrüchen, bei denen noch eine intakte Matrize vorhanden ist, die als Vorlage für die Reparatur dienen kann (Ismail *et al.* 2007). Aus diesem Grund wird beim Auftreten von DSBs ein distinktes zelluläres Erkennungs- sowie Reparatursystem aktiviert. Es kommt zur Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoints, um Zeit für die Reparatur zu gewinnen, sowie zur Reparatur der DSBs durch vornehmlich

zwei Mechanismen – das Nichthomologe Endjoining (NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR).

1.4.2.1 Die zelluläre Erkennung von DSBs

Doppelstrangbrüche werden sofort von Sensorproteinen erkannt. Eines der primären Aktivatoren der zellulären Antwort auf DSBs ist die Proteinkinase ATM (ataxia teleangiectasia mutated), die durch Autophosphorylierung aktiviert wird (Uziel *et al.* 2003). Es wird vermutet, dass die Aktivierung von ATM durch strukturelle Veränderungen des Chromatins nach einem DSB erfolgt (Bakkenist und Kastan 2003). Dabei dissoziieren die ursprünglichen Dimere voneinander. Als aktivierte Monomere phosphorylieren sie H2AX, eine Histonvariante von H2A, zu γ H2AX, sowie viele weitere Zielproteine, die die DNA-Schadensantwort modulieren (Kurz und Lees-Miller 2004). Um ATM am Ort des DNA-Strangbruchs zu akkumulieren, wird der MRN-Komplex benötigt. Dieser besteht aus MRE11, RAD50 sowie Nbs1 (Uziel *et al.* 2003; Stiff *et al.* 2005). Weitere Mediatoren sind nötig, um das Schadenssignal zu verstärken, darunter MDC1, 53BP1 und BRCA1. Diese binden durch ihre BRCT (BRCA1 carboxyl terminal) -Domäne, die sie gemeinsam haben, an phosphorylierte Peptide sowie an verschiedene Komponenten der DNA-Schadensantwort und fördern deren Interaktion untereinander (Su 2006).

MDC1 interagiert direkt mit γ H2AX mittels seiner BRCT-Domäne. Um 53BP1, Nbs1 und phosphoryliertes ATM an dem Ort eines DSBs zu akkumulieren, bedarf es der Interaktion von γ H2AX und dem MDC1-Komplex (Stucki *et al.* 2005). Weiterhin vermittelt MDC1 die Rekrutierung und Bindung von 53BP1 an den DNA-Bruch (Ward *et al.* 2003; Bekker-Jensen *et al.* 2006). Diese Ereignisse ermöglichen die Rekrutierung weiterer ATM-Moleküle, die wiederum weitere H2AX-Moleküle phosphorylieren können. Es kommt zu einer positiven Rückkopplung und sequenziellen Rekrutierung von MDC1, dem MRN-Komplex sowie ATM und das γ H2AX-Signal breitet sich aus (Grudzenski 2009).

1.4.2.2 Nichthomologes Endjoining (NHEJ)

Das NHEJ ist ein sehr schneller Reparaturprozess und gilt als das häufigste und wichtigste Reparaturverfahren bei Doppelstrangbrüchen, da es während der gesamten Inter-

phase möglich ist. Die freien Doppelstrangbruchenden werden vom Ku70/Ku80-Heterodimer erkannt und gebunden. An diesen Komplex wandern die Proteinkinase DNA-PK sowie eine Gruppe von sogenannten Sir-Proteinen, die den Bereich der DNA um den Doppelstrangbruch abdecken. Dies verhindert den Abbau der DNA-Enden durch Nukleasen, die Fusion der Enden mit anderen Chromosomen, die Transkription und Replikation der DNA und fixiert die freien DNA-Enden räumlich. Anschließend werden der Ligase IV-Komplex, welcher aus Ligase IV, XRCC4 und Cernunos/XLF besteht, rekrutiert und die DNA-Enden ligiert. Das NHEJ ist im Falle von Mehrfachschäden, bei denen einige Basenpaare fehlen (Bulky Lesions), eine potentiell mit Fehlern behaftete Reparatur, da die verbleibenden DNA-Enden miteinander verknüpft werden, ohne dass vorher eine Neusynthese des fehlenden oder fehlerhaften DNA-Stranges stattgefunden hat. Dies führt zu Verlusten oder Veränderungen des genetischen Codes der DNA, also zu Mutationen (Kauffmann *et al.* 2006; Helleday *et al.* 2007).

1.4.2.3 Homologe Rekombination (HR)

Im Gegensatz zum NHEJ ermöglicht es die homologe Rekombination, auch komplexe Schäden fehlerfrei zu reparieren. Die DSBs werden anhand der homologen Sequenzen der Schwesterchromatiden oder der homologen Chromosomen repariert. Auf diese Weise werden beschädigte oder verloren gegangene Sequenzinformationen resynthetisiert. Im ersten Schritt wird der MRN-Komplex rekrutiert, der den DSB erkennt und prozessiert. Dabei entstehen einzelsträngige Bereiche, die mit RPA besetzt werden. Im nächsten Schritt wird dieses durch Rad51 ersetzt, welches Filamente um den entwundenen DNA-Strang bildet, um die Stranginvasion der intakten Matrize zu ermöglichen. Die Komponenten der Rad52-Epistaxisgruppe katalysieren die Stranginvasion. Dabei entstehen sogenannte Doppel-Holiday-Strukturen, die nach Verlängerung des 3'-Endes der geschädigten DNA durch die DNA-Polymerase η und Reparatur durch Ligation mittels Ligase I wieder aufgelöst werden. Hierbei kann es im Falle von inkorrektter Auflösung zu Crossover-Ereignissen kommen. Im Gegensatz zum NHEJ kommt die HR nur in der Synthesephase des Zellzyklus vor (Khanna und Jackson 2001; Kauffmann *et al.* 2006; Pardo *et al.* 2009).

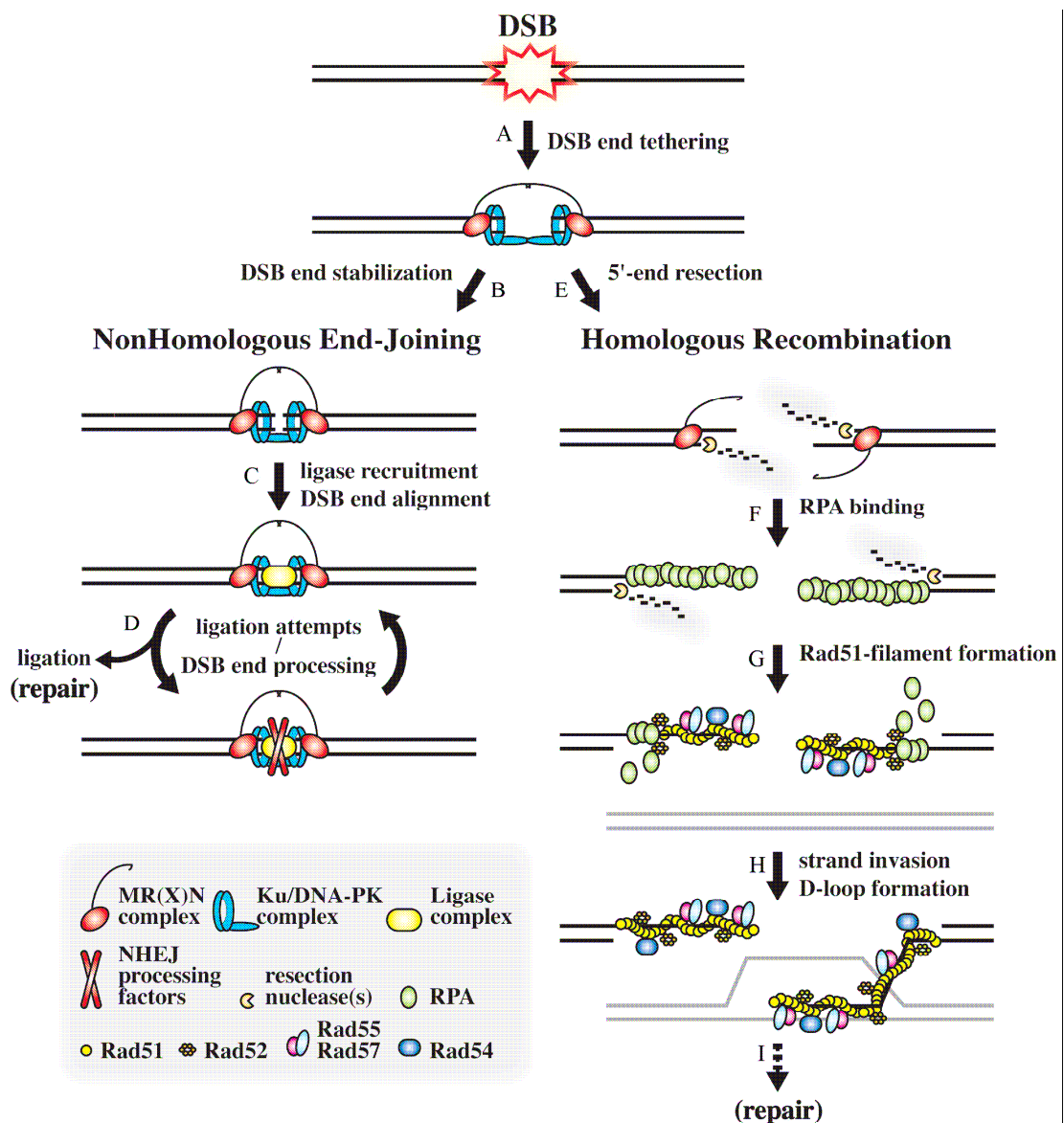


Abb. 2: Schematisches Modell der primären Reparaturmechanismen von DSBs – NHEJ und HR. (Pardo et al. 2009)

1.5 Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen

Da es bei fehlerhafter Reparatur von Doppelstrangbrüchen zur malignen Entartung kommen kann, ist es von großem Interesse, DSBs nachzuweisen und zu quantifizieren. In den vergangenen Jahrzehnten haben sich verschiedene Verfahren zum Nachweis von Doppelstrangbrüchen etabliert. Dazu gehören die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) (Birren et al. 1988), der Comet-Assay (Fairbairn et al. 1995), die Quantifizierung von Chromatidbrüchen mittels der vorzeitigen Chromosomenkondensation (premature

chromosome condensation, PCC) (Johnson und Rao 1970), die TUNEL-Methode (Hewitson *et al.* 2006) sowie die γ -H2AX-Methode (Takahashi und Ohnishi 2005). Um DSBs im Niedrigdosisbereich, wie z.B. in der Computertomographie, zu detektieren, hat sich die γ -H2AX-Methode als Goldstandard etabliert (Fernandez-Capetillo *et al.* 2004). Grund ist, dass allein diese Methode bei niedrigen Strahlendosen von bis zu einem mGy sensitiv ist (Rothkamm und Lobrich 2003).

1.5.1 γ H2AX

Die DNA, der Träger der Erbinformation, ist in eukaryonten Zellen in Form von Chromatinfäden, Chromosomen genannt, im Nukleus organisiert. Nukleosomen ermöglichen die dichte Verpackung der DNA im Nukleus und damit die effiziente Nutzung des minimalen Raumes. Ein Nukleosom ist ein Komplex aus DNA und Histonen. Histone sind basische Proteine, die an die DNA binden und in 5 Klassen eingeteilt werden (H1, H2A, H2B, H3 und H4). Ihre Aufgabe ist nicht nur die Kondensierung der DNA, sie wirken auch als Funktionsregulatoren, da z.B. die Transkription nur an histonfreier DNA möglich ist (Emminger und Benz 2005). Eine der H2A-Histon-Subfamilien, H2AX, hat sich seit einigen Jahrzehnten besonders hervor getan. Es wurde erstmals 1980 als eine Isoform des Histons H2A identifiziert und in den späten 80er Jahren sequenziert. H2AX scheint innerhalb des Chromatins gleichmäßig verbreitet zu sein und macht etwa 10% der H2A Population aus (Takahashi und Ohnishi 2005). Es besitzt als Besonderheit einen Serinrest 139 an seinem C-Terminus, der im Falle eines Doppelstrangbruches der DNA innerhalb von Minuten phosphoryliert wird und in diesem Zustand in der Literatur als γ H2AX bezeichnet wird. William Bonner entdeckte zuerst, dass γ H2AX eine Rolle in der DNA-Schadensantwort spielt (Fernandez-Capetillo *et al.* 2004). Die Dephosphorylierung von γ H2AX kommt der Reparatur eines Doppelstrangbruches gleich (Rothkamm und Lobrich 2003).

1.5.2 Die γ -H2AX-Methode zur Quantifizierung von DSBs

Mit der Entwicklung eines spezifischen γ H2AX-Antikörpers wurde eine neue Methode zur Detektion von DSBs erschaffen und als Marker für Doppelstrangbrüche verwendet

(Rogakou *et al.* 1998). Schon nach einer Minute bindet der spezifische γ H2AX-Antikörper (Rogakou *et al.* 1999) an γ H2AX und kann mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie in Form von deutlich sichtbaren Foci detektiert werden. Dabei entspricht ein Focus exakt einem Doppelstrangbruch und wird als einzelner fluoreszierender Punkt im Nukleus sichtbar. Hiermit können DSBs auf Einzelzellebene nachgewiesen werden (Rothkamm und Lobrich 2003). Dies macht die γ -H2AX-Methode zum Goldstandard der Messung von Induktion und Reparatur der DSBs und damit zu einem nützlichen Werkzeug, Strahlenschäden auch bei relativ niedrigen Strahlendosen zu messen, wie sie z.B. in der radiologischen Diagnostik zur Anwendung kommen (Fernandez-Capetillo *et al.* 2004).

2 Zielsetzung

Menschen sind täglich niedrigen Dosen ionisierender Strahlung ausgesetzt. Ursachen sind eine natürlich vorkommende Hintergrundstrahlung sowie vom Menschen selbst geschaffene Strahlenquellen. In der vom Menschen geschaffenen Strahlung hat die medizinische Strahlung den größten Anteil. Die Computertomographie stellt dabei die Hauptquelle der gegenwärtigen Strahlenexposition der Bevölkerung dar (Knollmann *et al.* 2006; Bundesamt für Strahlenschutz 2010).

Nach Bestrahlung sind Doppelstrangbrüche die gravierendsten Läsionen der DNA, da hierbei die genetische Information auf beiden DNA-Strängen unterbrochen wird (Ward 1995). Werden Doppelstrangbrüche nicht oder fehlerhaft repariert, kann es zur Entstehung von Mutationen und zur malignen Entartung von Zellen kommen (Jeggo und Lobrich 2007; Zhang *et al.* 2007). Bis heute wird das Krebsrisiko durch Röntgenstrahlung im Niedrigdosisbereich der Radiodiagnostik kontrovers diskutiert. Der Strahlenschutz orientiert sich bislang am LNT (linear no-threshold)-Modell, das besagt, dass das Krebsrisiko linear mit der applizierten Dosis ansteigt (Brenner *et al.* 2003; Preston 2003). In letzter Zeit wurden jedoch Beobachtungen gemacht, die dem derzeit gültigen Modell widersprechen (Seymour und Mothersill 2000; Joiner *et al.* 2001; Feinendegen 2005; Dropkin 2007). Da die Computertomographie heute zu den wichtigsten Methoden der radiologischen Diagnostik zählt und im klinischen Alltag mit steigender Tendenz eingesetzt wird, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Induktion und Reparatur von DSBs nach Computertomographie untersucht. Um die Bildgebung zu unterstützen, werden im Rahmen von Computertomographieuntersuchungen häufig Kontrastmittel appliziert. Deren Wirkung auf die Induktion und Reparatur von DSBs wurde im zweiten Teil dieser Arbeit evaluiert.

Die Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen mittels der γ -H2AX-Methode stellt momentan den Goldstandard zur Quantifizierung von DSBs im Niedrigdosisbereich dar (Fernandez-Capetillo *et al.* 2004). Diese Methode wurde für die vorliegende Arbeit gewählt, da Studien gezeigt haben, dass sie *in vivo* bei Lymphozyten anwendbar und die einzig sensitive Methode im Niedrigdosisbereich von mGy ist. Weiterhin wurde festgestellt, dass ein Focus exakt einem Doppelstrangbruch entspricht und der Verlust von γ -

H2AX-Foci der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen entspricht (Rothkamm und Lobrich 2003; Lobrich *et al.* 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte

1. die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen nach einer Computertomographieuntersuchung quantifiziert werden,
2. die Kinetik der Reparatur von DSBs nach einer Computertomographie dargestellt werden,
3. ein Vergleich der Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen von nativer Computertomographie und Computertomographie mit Kontrastmittelapplikation sowie
4. ein Vergleich der Kinetik der Reparatur von nativer Computertomographie und Computertomographie mit Kontrastmittelgabe erstellt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller, Ort
Computertomograph	Sensation 64 dual-source 64-detector MS-CT	Siemens Medical Solutions, Forchheim, Germany
Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera	Axiovert 200 M inverted fluorescence microscope	Carl Zeiss Jena, Germany
Imaging Software	Wasabi	Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan
Mikroskop	Leitz DiaLux	Leitz, Wetzlar, Germany
Mikroskop	Olympus Phase Contrast ULWCD 0,30	Olympus, Japan
Software	Axiovision	Carl Zeiss Jena, Germany
Sterile Werkbank	Sicherheitswerkbank HeraSafe	Heraeus, Hanau, Germany
Sterile Werkbank	Modell ET 130V/UV	Ehret, Emmerdingen, Germany
Zellzählkammer	Neubauer Improved Bright Line	Brand, Wertheim, Germany
Zentrifuge	Labofuge 400	Heraeus, Hanau, Germany
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau, Germany

3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Typ	Hersteller, Ort
Fluorescent Mounting Medium		Dako, Hamburg, Deutschland
Lymphozytentrennmedium	LSM-Trennmedium	PAA, Cölbe, Germany
Methanol	100% Methanol, technisch	ACROS Organics, New Jersey, USA
PBS: 137 mM NaCl 2,7 mM KCL 6,5 mM Na ₂ HPO ₄		Roth, Karlsruhe, Deutschland
Serum	FBS (Fetal Bovine Serum)	PAA, Cölbe, Deutsch- land
Triton X-100		Roth, Karlsruhe, Deutschland

Das verwendete Wasser entstammte in allen Fällen der MiliQ UF-Anlage (Fa. Millipore, Erkrath).

3.1.3 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Antikörper/Farbstoff	Typ	Hersteller, Ort
Primärer Antikörper	Anti-phospho-Histone 2A.X (Ser139), clone JBW301	Millipore, Schwalbach/Ts., Germany
Sekundärer Antikörper	PF-488 Goat anti-Mouse IgG conjugate	Promokine, Promocell, Heidelberg, Deutschland
Zellkernfarbstoff DAPI	4',6-Diamidino-2- phenylindole dihydrochloride	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland

3.1.4 Blutentnahme

Material	Typ	Hersteller, Ort
Monovetten	S-Monovette 5,5 ml AH	Sarstedt, Nümbrecht, Deutsch- land
Venenpunktionsbesteck	Multifly Set	Sarstedt, Nümbrecht, Deutsch- land

3.1.5 Sonstige Materialien

Material	Typ	Hersteller
50 ml Röhrchen		Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser		Menzel, Braunschweig, Deutschland
Leucosep-Röhrchen	Leucosep®	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Germany
Objektträger	SuperFrost plus	Menzel, Braunschweig, Deutschland

3.2 Patientenuntersuchung

3.2.1 Studienprotokoll

Das Studienprotokoll wurde der Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg zur Begutachtung vorgelegt. Dem Protokoll wurde am 31.05.2007 zugestimmt.

3.2.2 Einverständnis

Alle Patienten wurden vor ihrer klinisch indizierten CT-Untersuchung über die Studie aufgeklärt. 24 Stunden vor der CT-Untersuchung erfolgte ein ausführliches Aufklärungsgespräch und die Aushändigung einer schriftlichen Patienteninformation. Voraussetzung für die Aufnahme der Patienten in die Studie war deren schriftliches Einverständnis und das Nichtvorhandensein von Ausschlusskriterien.

3.2.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Das Einschlusskriterium für die Studie stellte eine klinische Indikation zur Durchführung einer Computertomographie des Thorax, des Abdomens, des Cranium, der Extremitäten, des Pelvis oder der Gefäße dar, mit oder ohne Applikation von Kontrastmitteln.

Ausschlusskriterien waren vergangene oder derzeit bestehende Erkrankungen an Leukämie oder Lymphom, Strahlentherapie innerhalb der letzten 6 Monate, Röntgenuntersuchung oder Szintigraphie innerhalb der letzten 3 Tage sowie Alter unter 18 Jahren.

3.2.4 Patientenkollektiv

Insgesamt beteiligten sich 47 Patienten an der Studie, 35 männliche und 12 weibliche mit einem mittleren Alter von 57,02 Jahren. Das Patientenkollektiv wurde in zwei Gruppen eingeteilt. Gruppe I erhielt ein natives CT, Gruppe II dagegen eine CT-Untersuchung mit Kontrastmittel. Die erste Gruppe schloss 21 Patienten ein, davon 6 weibliche und 15 männliche. Das mittlere Alter dieser Gruppe betrug 59 Jahre. Gruppe II bestand aus 26 Patienten, 6 weiblichen und 20 männlichen. Das mittlere Alter dieser Gruppe betrug 55,04 Jahre.

3.2.5 Blutentnahme

Allen Patienten wurde steril mittels Multifly Set-Venenpunktionsbesteck oder aus einem bereits vorhandenen peripheren Venenzugang Blut aus einer oberflächlichen Veine der oberen Extremität entnommen. Die Blutentnahme erfolgte in Monovetten mit Ammonium-Heparin. Pro Zeitschritt wurden etwa 5 ml Blut entnommen.

3.2.6 Zeitlicher Ablauf der Untersuchungen

Die Blutentnahme der Patienten erfolgte zu folgenden Zeitpunkten:

Untersuchungszeitpunkt	Bezeichnung im laufenden Text
Unmittelbar vor dem CT als Kontrolle	Untersuchungszeitpunkt 1
5 min nach der CT-Untersuchung	Untersuchungszeitpunkt 2
1 h nach der CT-Untersuchung	Untersuchungszeitpunkt 3
2 h nach der CT-Untersuchung	Untersuchungszeitpunkt 4
24 h nach der CT-Untersuchung	Untersuchungszeitpunkt 5

3.3 Methoden

Soweit nicht anders beschrieben, wurden Zentrifugations- und Waschschr itte sowie Inkubationen bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.3.1 Computertomographie

Die CT-Untersuchungen waren klinisch indiziert und die Patienten erfüllten die Ein- und Ausschlusskriterien. Gruppe I bestand aus 21 Patienten, die ein natives CT erhielten. 8 Patienten dieser Gruppe erhielten eine Thorax-CT-Untersuchung, 2 Patienten ein Abdomen-CT, 7 Patienten ein CT der Extremitäten, 3 Patienten eine craniale Computertomographie und 1 Patient ein Pelvis-CT. Bei den 26 Patienten der Gruppe II erfolgte die Computertomographie mit Kontrastmittel. 16 Patienten der Gruppe II bekamen ein CT des Thorax, 5 Patienten ein CT des Abdomens, 1 Patient eine craniale Computertomographie, 2 Patienten Angio-CTs und 2 Patienten erhielten ein CT des Thorax und des Abdomens in der gleichen Sitzung. Das applizierte Kontrastmittel war in 24 Fällen Iopromid 370mg Iod/ml (Ultravist 370, Bayer Vital, Leverkusen) und wurde in einer Menge von 50 - 120 ml verwendet. In zwei Fällen verwendete man das Kontrastmittel Iopromid in der Dosierung 300 mg Iod/ml (Ultravist 300, Bayer Vital, Leverkusen). In diesen Fällen wurden 50 ml für ein Thorax-CT verwendet sowie 60 ml für eine craniale CT-Untersuchung. Die Computertomographie erfolgte mit einem Sensation 64 dual-source 64-detector MS-CT (Siemens Medical Solutions, Forchheim, Germany) mit fol-

genden Parametern: 120 kVp, Rotationszeit von 0,5 s und einer Matrix von 512 x 512. Das Dosislängenprodukt, das aus der Summe der Produkte des volumenbezogenen CT Dosisindex ($CTDI_{vol}$) und der Scanlänge für jede Phase berechnet wird, variierte zwischen 54 und 2554 mGy·cm.

3.3.2 Isolierung und Fixierung der Lymphozyten

Alle Proben wurden direkt nach der Blutentnahme auf Eis gelagert und unmittelbar weiterverarbeitet. Die maximale Zeitverzögerung betrug 30 Minuten.

Das entnommene Blut wurde 1:2 in PBS in einem 50 ml Röhrchen verdünnt. Anschließend wurde das Blut-PBS-Gemisch in ein Leucosep[®]-Röhrchen gegeben, das zuvor mit 15 ml Lymphozytentrennmedium befüllt und 30 s bei 1000 x g mit Bremse zentrifugiert wurde. Es folgte eine Zentrifugation bei 1.200 x g für 20 min bei ausgeschalteter Bremse. Der Überstand wurde in ein 50 ml Röhrchen gegeben und 10 ml PBS hinzugefügt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation des Gemisches bei 250 x g mit Bremse wurde der Überstand abdekantiert und das vorhandene Lymphozyten-Pellet in 10 ml PBS aufgelöst und wiederum für 5 min bei 250 x g mit Bremse zentrifugiert. Nach erneutem Wiederholen des Waschvorganges erfolgte ein nochmaliges Abdekantieren des Überstandes und eine Resuspension des Pellets in 3 ml PBS. Von diesem Gemisch wurden 10 µl entnommen und mit Hilfe einer Neubauer Zellzählkammer die Lymphozytenzahl ermittelt. Nach einem erneuten Waschgang wurde die PBS-Menge errechnet, die zugegeben werden muss, um in 5 µl 50.000 Zellen zu erhalten. Folgende Formel wurde hierfür verwendet:

$$x\mu\text{l PBS} = (5\mu\text{l}/50.000 \text{ Zellen}) \times \text{Gesamtzellzahl}$$

Das Pellet wurde mit der errechneten Menge PBS resuspendiert. Pro Untersuchungszeitpunkt wurde auf einem Objektträger zur Doppelbestimmung an 2 getrennten Stellen je 5 µl des Lymphozyten-PBS-Gemisches aufgebracht. Vor der Lufttrocknung unter der clean bench erfolgte im Mikroskop eine Kontrolle der Zelldichte.

Zur Fixierung wurden die Objektträger 30 min bei -20°C mit Methanol inkubiert. Anschließend wurden die Proben sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C in Alufolie verpackt aufbewahrt.

3.3.3 Immunfluoreszenzfärbung

Zunächst wurden die Zellen 30 min in 0,5% Triton X-100 und PBS permeabilisiert und über Nacht mit PBS und 0,5% Triton X-100 sowie 10% FKS bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die einstündige Inkubation der Proben mit 100 µl des primären Antikörpers in einer 1:200 Verdünnung, versetzt mit PBS und 0,5% Triton X-100. Es schlossen sich 3 Waschgänge zu je 10 min in PBS und 1% FKS mit 0,5% Triton X-100 an.

Hiernach folgte die Applikation des sekundären Antikörpers in einer 1:200 Verdünnung mit PBS und 0,5% Triton X-100 sowie eine einstündige Inkubation bei Dunkelheit. Danach wurde dreimal zu je 10 min mit PBS und 1% FKS sowie 0,5% Triton X-100 gewaschen.

Zur Zellkernfärbung wurde für 5 min DAPI in einer 1:2000 Verdünnung auf die Zellen gegeben. Darauf folgten zwei abschließende Waschgänge mit PBS für jeweils 5 min. Abschließend wurden die Zellen mit Fluorescent Mounting Medium eingedeckelt und bei 4 °C im Dunkeln bis zum Mikroskopieren aufbewahrt.

3.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Untersuchung des Reparaturvermögens wurde die Anzahl an γ H2AX-Foci herangezogen, welche ein Maß für die Anzahl an Doppelstrangbrüchen (DSBs) ist. Bei allen Präparaten erfolgte die Auswertung per Auge mit 630facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop. Mit Hilfe der CCD-Kamera und der Axiovision Software wurden die Zellen fotografiert. Dabei wurden pro Zeitschritt von den zwei separaten Zellarealen eines Objektträgers jeweils mindestens 40 Zellen fotografiert und später mit Hilfe der Wasabi Imaging Software die Foci ausgezählt. Für die Auswertung der Lymphozyten wurden Granulozyten und Monozyten anhand morphologischer Kriterien ausgeschlossen.

4 Ergebnisse

4.1 Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen in vivo nach Computertomographie mittels γ -H2AX-Foci

In dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen die Darstellung von γ -H2AX-Foci durch Immunfluoreszenz verwendet.

4.1.1 Patientenmerkmale und Focizahlen

Die Bestimmung der Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle erfolgte bei insgesamt 47 Patienten.

Untersuchungszeitpunkt	Bezeichnung im laufenden Text
Unmittelbar vor dem CT als Kontrolle	Untersuchungszeitpunkt 1
5 min nach der CT-Untersuchung	Untersuchungszeitpunkt 2
1 h nach der CT-Untersuchung	Untersuchungszeitpunkt 3
2 h nach der CT-Untersuchung	Untersuchungszeitpunkt 4
24 h nach der CT-Untersuchung	Untersuchungszeitpunkt 5

Tab. 1: Übersicht der Zeitpunkte der Blutabnahme

24 Patienten erhielten ein Thorax-CT, 7 Patienten ein Abdomen-CT, 7 Patienten ein Extremitäten-CT, 4 Patienten ein CCT, 2 Patienten Angio-CTs, 1 Patient ein Pelvis-CT sowie 2 Patienten ein Thorax- und Abdomen-CT während einer Untersuchung. Die Computertomographieuntersuchungen führten zu einem mittleren Dosislängenprodukt (DLP) von 528 mGy·cm. Dieses variierte zwischen 54 mGy·cm und 2554 mGy·cm.

Patient	DLP (mGy·cm)	Foci prä CT	Foci 5 min post CT	Foci 1 h post CT	Foci 2 h post CT	Foci 24 h post CT	Alter	Geschlecht	Art des CTs
1	900	0,021	0,094	0,048	0,038	0,023	75	m	CCT
2	54	0,018	0,340	0,183	0,125	0,000	45	m	CCT
3	318	0,061	0,178	0,109	0,085	0,059	83	m	Thorax-CT
4	85	0,073	0,150	0,140	0,116	0,108	26	w	Extremitäten-CT
5	246	0,037	0,083	0,056	0,038	0,019	80	m	Thorax-CT
6	518	0,021	0,362	0,348	0,300	0,118	63	w	Thorax-CT
7	677	0,018	0,127	0,109	0,082	0,034	38	m	Abdomen-CT
8	55	0,044	0,151	0,088	0,068	0,000	39	m	CCT
9	243	0,133	0,286	0,234	0,209	0,140	67	m	Extremitäten-CT
10	216	0,014	0,149	0,086	0,061	0,023	56	w	Thorax-CT
11	230	0,021	0,156	0,109	0,095	0,058	69	m	Thorax-CT
12	233	0,171	0,256	0,162	0,133	0,114	87	m	Extremitäten-CT
13	189	0,000	0,091	0,067	0,049	0,044	24	m	Extremitäten-CT
14	252	0,068	0,148	0,125	0,114	0,093	57	m	Extremitäten-CT
15	350	0,019	0,083	0,082	0,041	0,017	59	m	Abdomen-CT
16	247	0,039	0,105	0,093	0,053	0,045	80	m	Thorax-CT
17	220	0,038	0,123	0,100	0,053	0,055	62	w	Thorax-CT
18	362	0,072	0,357	0,066	0,060	0,052	38	m	Extremitäten-CT
19	198	0,067	0,140	0,125	0,073	0,070	39	w	Pelvis-CT
20	326	0,021	0,237	0,093	0,100	0,095	73	m	Thorax-CT
21	78	0,087	0,200	0,167	0,144	0,111	79	w	Knie-CT
22	1004	0,058	0,155	0,153	0,115	0,069	46	w	Abdomen-CT
23	932	0,043	0,617	0,067	0,102	0,087	49	m	Thorax-CT
24	1070	0,000	0,140	0,120	0,075	0,000	25	m	Abdomen-CT

25	319	0,059	0,280	0,146	0,094	0,066	61	w	Thorax-CT
26	246	0,000	0,188	0,161	0,122	0,088	65	w	Thorax-CT
27	545	0,043	0,245	0,167	0,059	0,048	55	m	Abdomen-CT
28	2554	0,031	0,098	0,090	0,056	0,018	20	m	Thorax- u. Abdomen-CT
29	1953	0,163	0,220	0,143	0,354	0,174	77	m	Thorax-CT
30	390	0,036	0,143	0,130	0,085	0,065	62	w	Thorax-CT
31	301	0,038	0,149	0,071	0,061	0,020	67	m	Thorax-CT
32	355	0,034	0,117	0,080	0,074	0,027	70	m	Thorax-CT
33	2050	0,020	0,214	0,135	0,115	0,000	31	m	Thorax-CT
34	297	0,021	0,167	0,111	0,067	0,000	36	m	Thorax-CT
35	812	0,021	0,429	0,095	0,077	0,049	67	w	Thorax- u. Abdomen-CT
36	231	0,032	0,084	0,070	0,068	0,044	64	m	Thorax-CT
37	388	0,061	0,412	0,364	0,182	0,000	63	m	Thorax-CT
38	222	0,067	0,127	0,109	0,094	0,093	25	m	Abdomen-CT
39	325	0,058	0,317	0,234	0,104	0,050	64	m	Thorax-CT
40	319	0,028	0,100	0,082	0,073	0,044	57	w	Thorax-CT
41	900	0,050	0,183	0,132	0,052	0,048	70	m	CCT
42	569	0,000	0,216	0,136	0,073	0,043	57	m	Thorax-CT
43	558	0,064	0,304	0,277	0,145	0,083	70	m	Thorax-CT
44	423	0,022	0,175	0,122	0,102	0,045	56	m	Abdomen-CT
45	717	0,163	0,236	0,109	0,188	0,070	77	m	Thorax-CT
46	339	0,036	0,204	0,091	0,083	0,063	46	m	Angio-CT
47	999	0,045	0,094	0,085	0,068	0,227	51	m	Angio-CT

Tab. 2: Ergebnisübersicht aller Patienten nach Computertomographie. Die Patienten 1 bis 21 entstammen der Patientengruppe I und erhielten ein CT ohne Kontrastmittel, bei den Patienten 22 bis 47 handelt es sich um die Patientengruppe II, bei der während der CT-Untersuchung Kontrastmittel appliziert wurde.

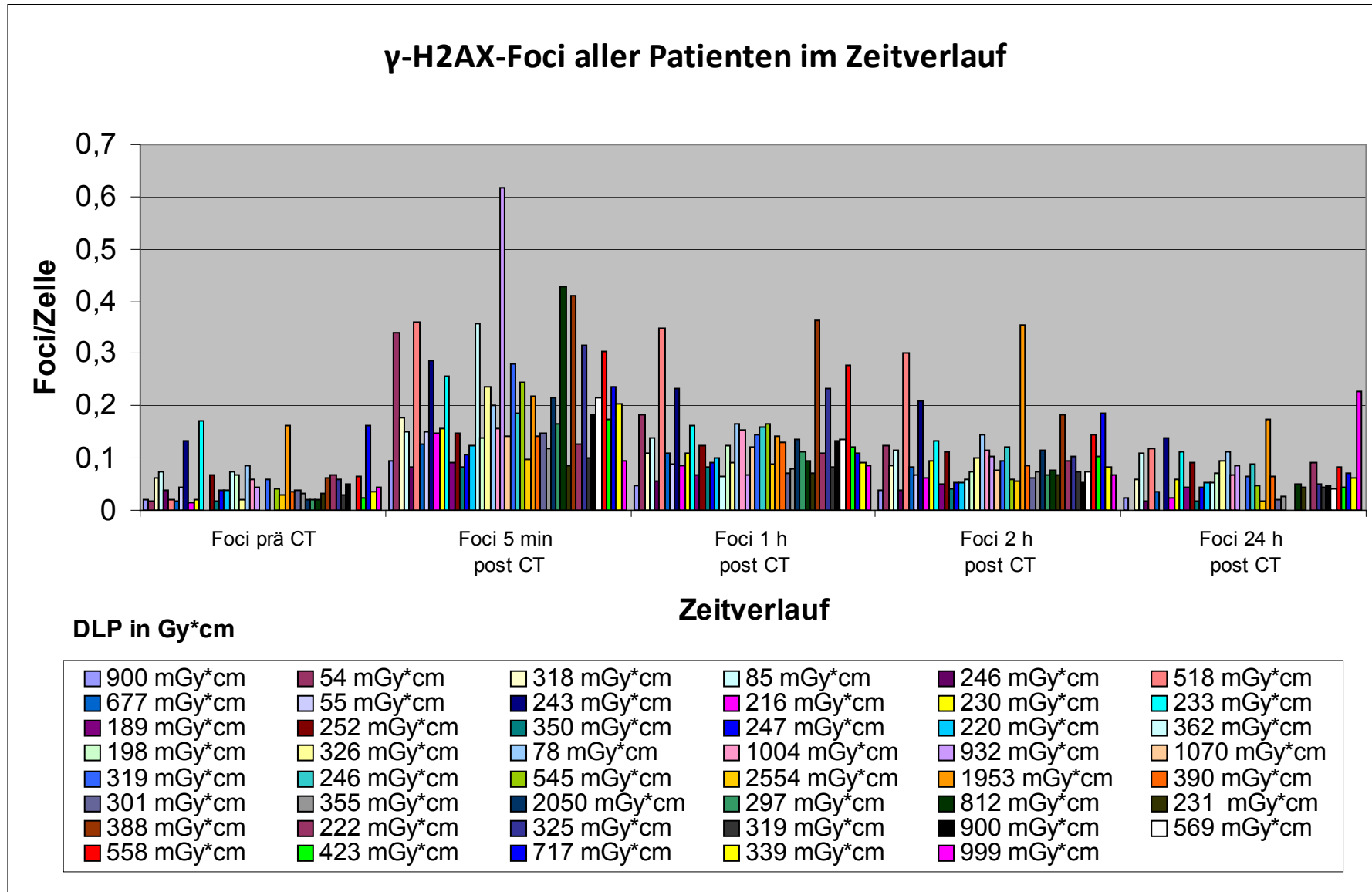


Abb.1: Übersicht der Kinetik der γ-H2AX-Foci aller Patienten. Jede Farbe entspricht einem Patienten.

4.1.2 Focizahlen aller Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Computertomographieuntersuchung

Im Durchschnitt fand sich bei den Patienten zum Untersuchungszeitpunkt 1 ein Hintergrundlevel von $0,048 \pm 0,04$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) γ -H2AX-Foci pro Zelle. Zum Untersuchungszeitpunkt 2 erhöhten sich diese auf durchschnittlich $0,201 \pm 0,108$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Foci pro Zelle. Vergleicht man den Untersuchungszeitpunkt 2 mit Untersuchungszeitpunkt 1, dann erhöhte sich das Focuslevel nach Röntgenexposition des Blutes um den Faktor 4,2.

Zum Zeitpunkt der 3. Untersuchung reduzierte sich der gemittelte Focuswert pro Zelle auf $0,129 \pm 0,065$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). Sieht man die Focuszahl zum Untersuchungszeitpunkt 2 als 100% an, dann verringerte sich die Anzahl der γ -H2AX-Foci zum Untersuchungszeitpunkt 3 auf $70\% \pm 21\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Zum Untersuchungszeitpunkt 4 fanden sich durchschnittlich $0,101 \pm 0,061$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Foci pro Zelle. Zu diesem Zeitpunkt bestanden noch $54\% \pm 24\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Doppelstrangbrüche im Vergleich zu Untersuchungszeitpunkt 2.

Zum Untersuchungszeitpunkt 5 lag der Wert bei durchschnittlich $0,06 \pm 0,046$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Foci pro Zelle. Bezogen auf das Focuslevel des Untersuchungszeitpunktes 2 waren in diesem Moment noch $35\% \pm 36\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Doppelstrangbrüche vorhanden. Die Focusanzahl zum Untersuchungszeitpunkt 5 lag noch um 25% über dem Wert des Untersuchungszeitpunktes 1.

Alter in Jahren	DLP (mGy·cm)	Foci prä CT	Foci 5 min post CT	Foci 1 h post CT	Foci 2 h post CT	Foci 24 h post CT
$56,8 \pm 17,38$	$527,98$ $\pm 511,25$	$0,048 \pm 0,04$	$0,201$ $\pm 0,108$	$0,129$ $\pm 0,065$	$0,101$ $\pm 0,061$	$0,06$ $\pm 0,046$

Tab. 3: Mittelwerte aller Patienten mit \pm Standardabweichung der Mittelwerte.

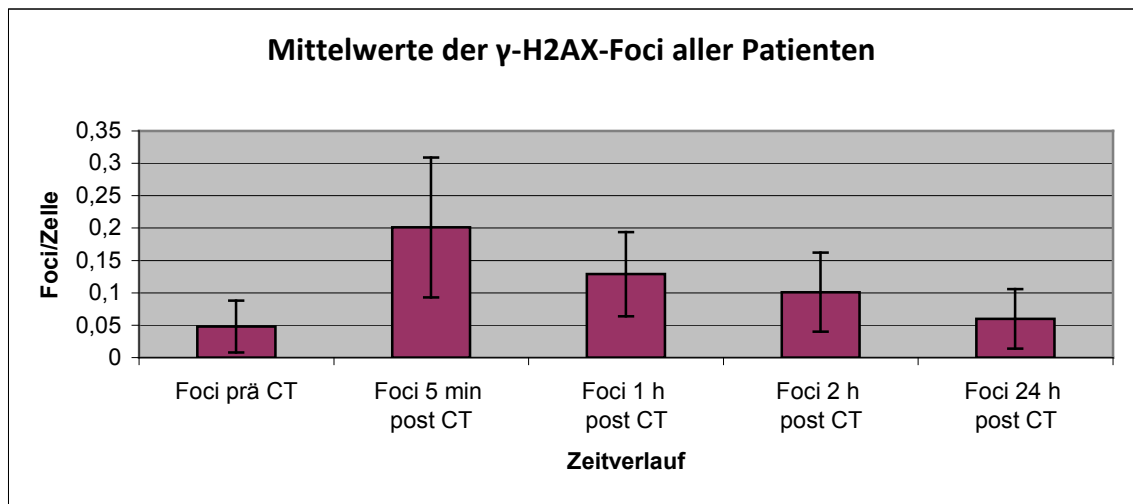
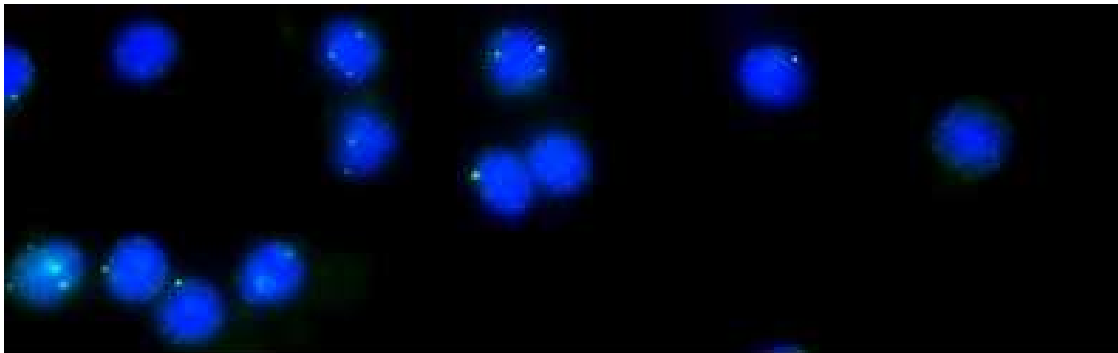
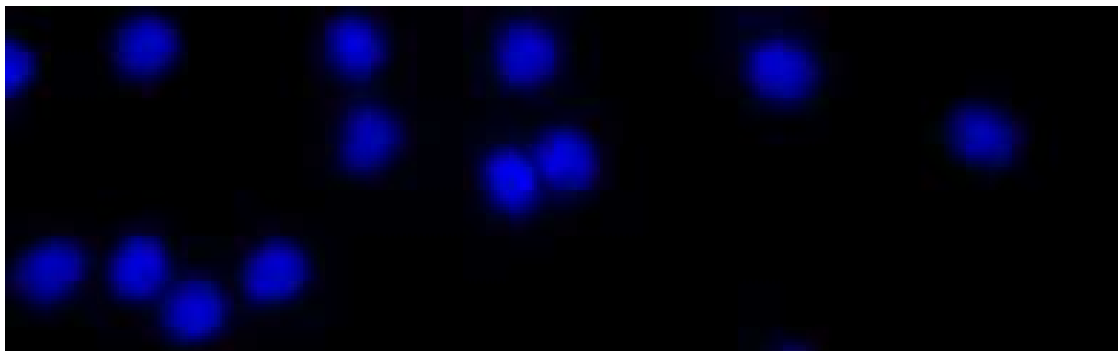


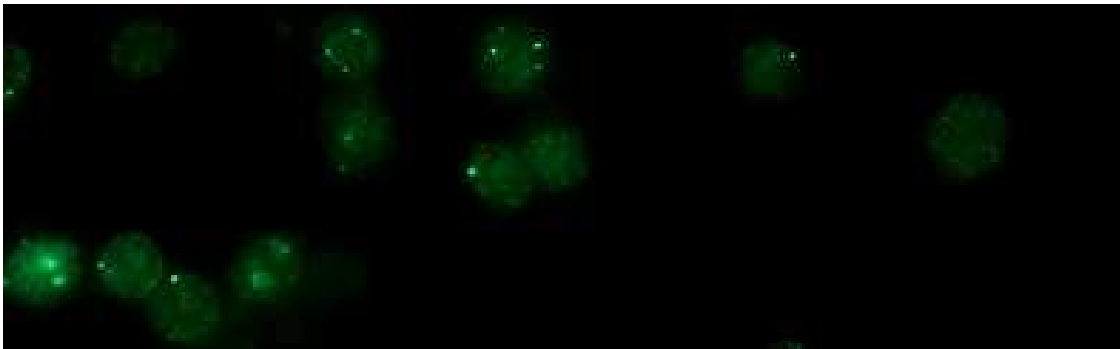
Abb. 2: Kinetik der γ -H2AX-Foci als Mittelwert aller Patienten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte.



A



B



C

Abb. 3: Darstellung von γ -H2AX-Foci in humanen Lymphozyten nach Computertomographie. Immunfluoreszenzaufnahmen humaner Lymphozyten bei 630facher Vergrößerung. Zur Visualisierung der DSBs wurden die Zellen mittels FITC, welches gegen γ -H2AX-Primärantikörper gerichtet war, markiert (siehe Abb. C, grün). Die DNA der Zellkerne wurde mit DAPI angefärbt (siehe Abb. B, blau). In der Überlagerung in Abb. A ist zu erkennen, dass sich die DSBs in den Zellkernen befinden.

4.2 Untersuchung des Kontrastmitteleffektes in vivo nach Computertomographie

4.2.1 Aufteilung der Patienten in zwei Gruppen

Alle 47 Patienten wurden in zwei Patientengruppen eingeteilt. Gruppe I erhielt ausschließlich native CT-Untersuchungen, Gruppe II dagegen nur CTs mit Kontrastmittel. Patienten beider Gruppen erhielten die Blutabnahmen zu den gleichen Zeitpunkten und bei beiden wurde die Anzahl der Doppelstrangbrüche mittels γ -H2AX-Immunfluoreszenz bestimmt.

4.2.2 Merkmale von Gruppe I

Gruppe I bestand aus 21 Patienten. 8 Patienten dieser Gruppe erhielten ein Thorax-CT, 2 Patienten ein Abdomen-CT, 7 Patienten ein CT der Extremitäten, 3 Patienten eine craniale Computertomographie und 1 Patient ein Pelvis-CT. Das mittlere Dosislängenprodukt (DLP) betrug 286 mGy·cm und variierte zwischen 54 mGy·cm und 900 mGy·cm.

4.2.3 Merkmale von Gruppe II

In Gruppe II fanden sich 26 Patienten, von denen 18 Patienten Computertomographien des Thorax, 7 Patienten ein CT des Abdomens, 1 Patient eine craniale Computertomographie sowie 2 Patienten Angio-CTs erhielten. Hier wurde ein mittleres Dosislängenprodukt (DLP) von 724 mGy·cm erreicht, das sich zwischen 222 mGy·cm und 2554 mGy·cm bewegte.

Patienten	Alter in Jahren	DLP (mGy·cm)	Foci prä CT	Foci 5 min post CT	Foci 1 h post CT	Foci 2 h post CT	Foci 24 h post CT
Gruppe I	59 ± 18,88	285,57 ± 198,27	0,05 ± 0,041	0,182 ± 0,088	0,123 ± 0,067	0,097 ± 0,062	0,061 ± 0,041
Gruppe II	55,04 ± 15,84	723,77 ± 595,77	0,046 ± 0,04	0,216 ± 0,12	0,134 ± 0,07	0,103 ± 0,06	0,058 ± 0,05

Tab. 4: Mittelwerte und ± Standardabweichung der Mittelwerte zum Vergleich von Gruppe I und II.

Gruppe I entspricht allen Patienten mit nativen CTs, Gruppe II beinhaltet alle Patienten mit Kontrastmittelapplikation während der CT-Untersuchung.

4.2.4 Anzahl der Doppelstrangbrüche im Zeitverlauf von Patienten ohne Kontrastmittelapplikation

Die durchschnittliche Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle stieg zum Untersuchungszeitpunkt 2 (im Durchschnitt $0,182 \pm 0,088$ [Mittelwert ± Standardabweichung] Foci pro Zelle) im Vergleich zur Blutprobe des 1. Untersuchungszeitpunktes (durchschnittlich $0,05 \pm 0,041$ [Mittelwert ± Standardabweichung] Foci pro Zelle) gemittelt über alle 21 Patienten um den Faktor 3,7 an.

Zum Untersuchungszeitpunkt 3 waren noch $0,123 \pm 0,067$ (Mittelwert ± Standardabweichung) Foci pro Zelle vorhanden. Vergleicht man diesen Wert mit dem des 2. Untersuchungszeitpunktes, dann reduzierte sich die Anzahl der Doppelstrangbrüche zum 3. Untersuchungszeitpunkt auf $71\% \pm 20\%$ (Mittelwert ± Standardabweichung).

Der mittlere Focuswert verringerte sich bei Untersuchung 4 weiter auf $0,097 \pm 0,062$ (Mittelwert ± Standardabweichung) Foci pro Zelle. Bezogen auf die Focusanzahl des Untersuchungszeitpunktes 2 bestanden noch $53\% \pm 16\%$ (Mittelwert ± Standardabweichung) der Doppelstrangbrüche.

Zum 5. Untersuchungszeitpunkt des Blutes fanden sich $0,061 \pm 0,041$ (Mittelwert ± Standardabweichung) Foci pro Zelle. Bezogen auf das Focuslevel des Untersuchungs-

zeitpunktes 2 waren in diesem Moment noch $35\% \pm 19\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Doppelstrangbrüche vorhanden. Der Durchschnittswert zum Untersuchungszeitpunkt 5 lag 22% über dem des Untersuchungszeitpunktes 1.

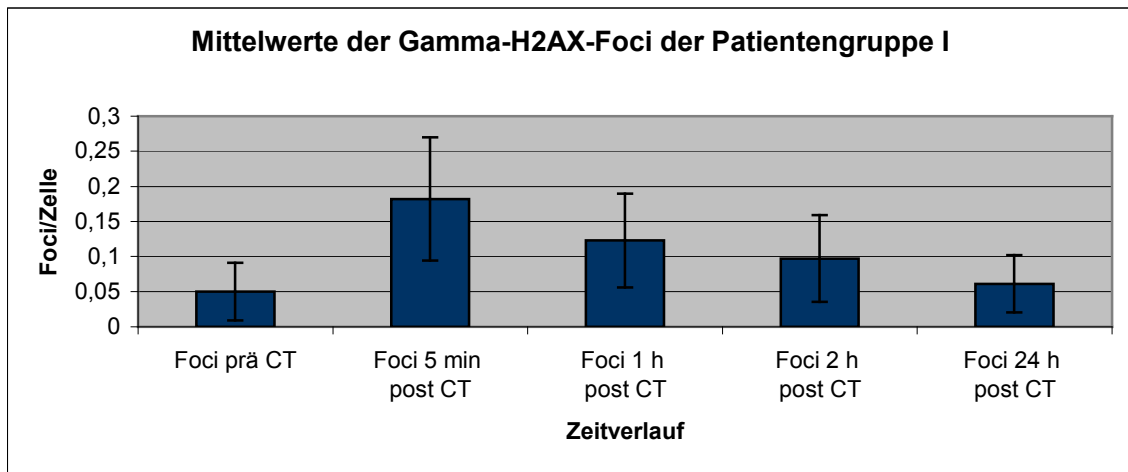


Abb. 4: Kinetik der γ -H2AX-Foci von Patienten ohne Kontrastmittelapplikation. Säulen stellen Mittelwerte aller Patienten dieser Gruppe dar und Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte.

4.2.5 Anzahl der Doppelstrangbrüche im Zeitverlauf von Patienten mit Kontrastmittelapplikation

Die durchschnittliche Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle stieg zum Untersuchungszeitpunkt 2 ($0,216 \pm 0,119$ [Mittelwert \pm Standardabweichung] Foci pro Zelle) im Vergleich zur Blutprobe des Untersuchungszeitpunktes 1 ($0,046 \pm 0,039$ [Mittelwert \pm Standardabweichung] Foci pro Zelle) um den Faktor 4,7 an.

Der Mittelwert der Anzahl der Doppelstrangbrüche pro Zelle zum Untersuchungszeitpunkt 3 ergab eine Focusanzahl von $0,134 \pm 0,066$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) pro Zelle. Im Vergleich zum Untersuchungszeitpunkt 2 entspricht dies einem Rückgang der Doppelstrangbrüche auf $70\% \pm 21\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Zum 4. Untersuchungszeitpunkt waren noch $0,103 \pm 0,061$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Foci pro Zelle vorhanden. Die Anzahl der Doppelstrangbrüche verringerte sich bezogen auf den 2. Untersuchungszeitpunkt auf $55\% \pm 28\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Der mittlere Focuswert reduzierte sich zum Untersuchungszeitpunkt 5 auf $0,058 \pm 0,05$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Foci pro Zelle. Bezogen auf das Focuslevel des Untersuchungszeitpunktes 2 waren in diesem Moment noch $36\% \pm 46\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Doppelstrangbrüche vorhanden. Der Durchschnittswert zum Untersuchungszeitpunkt 5 lag 27% über dem des Untersuchungszeitpunktes 1.

Patient	DLP (mGy·cm)	Foci prä CT	Foci 5 min post CT	Foci 1 h post CT	Foci 2 h post CT	Foci 24 h post CT	verwendetes KM
22	1004	0,058	0,155	0,153	0,115	0,069	120 ml Ultravist 370
23	932	0,043	0,617	0,067	0,102	0,087	120 ml Ultravist 370
24	1070	0,000	0,140	0,120	0,075	0,000	100 ml Ultravist 370
25	319	0,059	0,280	0,146	0,094	0,066	70 ml Ultravist 370
26	246	0,000	0,188	0,161	0,122	0,088	60 ml Ultravist 300
27	545	0,043	0,245	0,167	0,059	0,048	100 ml Ultravist 370
28	2554	0,031	0,098	0,090	0,056	0,018	110 ml Ultravist 370
29	1953	0,163	0,220	0,143	0,354	0,174	120 ml Ultravist 370
30	390	0,036	0,143	0,130	0,085	0,065	50 ml Ultravist 370
31	301	0,038	0,149	0,071	0,061	0,020	50 ml Ultravist 370
32	355	0,034	0,117	0,080	0,074	0,027	50 ml Ultravist 370
33	2050	0,020	0,214	0,135	0,115	0,000	120 ml Ultravist 370
34	297	0,021	0,167	0,111	0,067	0,000	50 ml Ultravist 370
35	812	0,021	0,429	0,095	0,077	0,049	120 ml Ultravist 370
36	231	0,032	0,084	0,070	0,068	0,044	50 ml Ultravist 370
37	388	0,061	0,412	0,364	0,182	0,000	50 ml Ultravist 370
38	222	0,067	0,127	0,109	0,094	0,093	50 ml Ultravist 370
39	325	0,058	0,317	0,234	0,104	0,050	80 ml Ultravist 370
40	319	0,028	0,100	0,082	0,073	0,044	50 ml Ultravist 370
41	900	0,050	0,183	0,132	0,052	0,048	60 ml Ultravist 300
42	569	0,000	0,216	0,136	0,073	0,043	50 ml Ultravist 300
43	558	0,064	0,304	0,277	0,145	0,083	120 ml Ultravist 370
44	423	0,022	0,175	0,122	0,102	0,045	100 ml Ultravist 370
45	717	0,163	0,236	0,109	0,188	0,070	120 ml Ultravist 370
46	339	0,036	0,204	0,091	0,083	0,063	80 ml Ultravist 370
47	999	0,045	0,094	0,085	0,068	0,227	120 ml Ultravist 370

Tab. 5: Übersicht der Ergebnisse und applizierten Kontrastmittel in Patientengruppe II

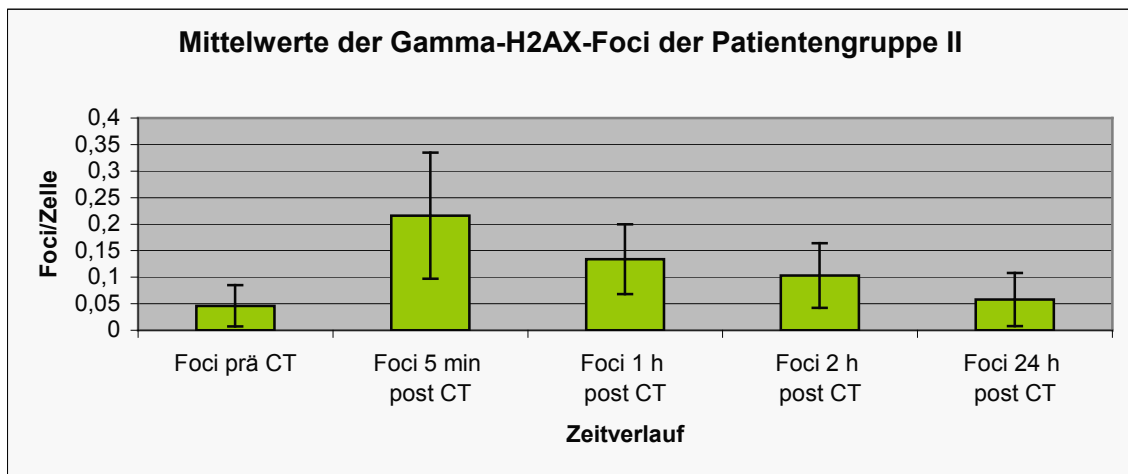


Abb. 5: Kinetik der γ -H2AX-Foci von Patienten mit Kontrastmittelapplikation. Säulen stellen Mittelwerte aller Patienten dieser Gruppe dar und Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte.

4.2.6 Vergleich von Gruppe I und II bezüglich der Kinetik der Doppelstrangbrüche

Beide Gruppen hatten ein ähnliches Hintergrundlevel an γ -H2AX-Foci, das zum Untersuchungszeitpunkt 1 bestimmt wurde. Dieses betrug $0,05 \pm 0,041$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Foci pro Zelle in Gruppe I und $0,046 \pm 0,039$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Foci pro Zelle in Gruppe II.

Nach der Computertomographie beobachteten wir in beiden Gruppen einen Anstieg der Doppelstrangbrüche, auf $0,182 \pm 0,088$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Foci pro Zelle in Gruppe I sowie auf $0,216 \pm 0,119$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Foci pro Zelle in Gruppe II. In Gruppe I war dieser Anstieg kleiner als in Gruppe II, bei den Patienten mit Kontrastmittelapplikation fanden wir um den Faktor 4,7 höhere Focizahlen während in der Gruppe der Patienten mit nativer Computertomographieuntersuchung nur eine Zunahme der Focizahlen um den Faktor 3,7 vorlag. Die Differenz der um das Hintergrundfocuslevel bereinigten Mittelwerte beider Gruppen betrug 0,038 Foci pro Zelle. Somit zeigte sich, dass Gruppe II um 29% mehr Doppelstrangbrüche aufwies als Gruppe I.

Zwischen den Untersuchungszeitpunkten 2 und 3 war in beiden Gruppen ein vergleichbarer Rückgang der Doppelstrangbrüche zu verzeichnen. In Gruppe I waren noch $71\% \pm 20\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Foci vorhanden ($0,123 \pm 0,067$

[Mittelwert \pm Standardabweichung] Foci pro Zelle) während in Gruppe II noch 70% \pm 21% (Mittelwert \pm Standardabweichung) zu finden waren ($0,134 \pm 0,066$ [Mittelwert \pm Standardabweichung] Foci pro Zelle).

Auch der Rückgang der Werte zwischen den Untersuchungszeitpunkten 3 und 4 verlief in beiden Gruppen ähnlich. In Gruppe I zeigte sich eine Reduktion auf $0,097 \pm 0,062$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Foci pro Zelle sowie in Gruppe II auf $0,103 \pm 0,061$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Foci pro Zelle. Patienten mit nativer Computertomographie wiesen noch $53\% \pm 16\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Doppelstrangbrüche des Untersuchungszeitpunktes 2 auf. Patienten mit Kontrastmittelapplikation dagegen zeigten eine Reduktion des Focuslevels auf $55\% \pm 28\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Zum 5. Untersuchungszeitpunkt erreichten beide Gruppen eine weitere Regression der Anzahl der Doppelstrangbrüche. In Vergleich zum Untersuchungszeitpunkt 2 wurde in Gruppe I die Focusanzahl auf $35\% \pm 19\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) vermindert und betrug durchschnittlich $0,061 \pm 0,041$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Foci pro Zelle. Die Focusanzahl in Gruppe II reduzierte sich auf $36\% \pm 46\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) und entsprach $0,058 \pm 0,05$ Foci pro Zelle (Mittelwert \pm Standardabweichung). Im Vergleich zum Untersuchungszeitpunkt 1 lagen die Werte in Gruppe I 22% und in Gruppe II 27% über den Ausgangswerten. Die Verringerung der Doppelstrangbrüche bis zum Untersuchungszeitpunkt 5 fand somit in beiden Gruppen in ähnlichem Ausmaße statt, wobei die Ausgangswerte nicht erreicht wurden.

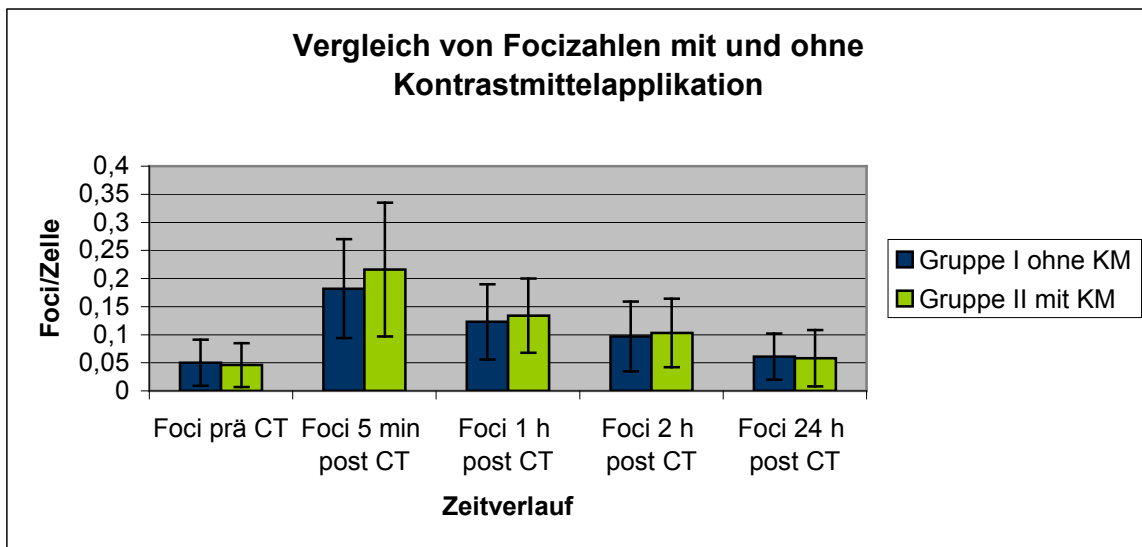


Abb. 6: Einfluss von Kontrastmittelapplikation auf die Kinetik der γ -H2AX-Foci. Gegenüberstellung der Mittelwerte der Patientengruppen I und II. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte.

4.2.6.1 Ergebnisse nach Subtraktion des Hintergrundfocuslevels

Die DNA kann durch verschiedenste exogene sowie endogene Einflüsse geschädigt werden. Auch ohne artifizielle Schädigung durch z.B. medizinische Untersuchungen mit Röntgenstrahlung sind die meisten Zellen einer permanenten Schädigung der DNA ausgesetzt. Zum Untersuchungszeitpunkt 1 wurde diese Anzahl der ständig vorhandenen Doppelstrangbrüche ermittelt und als „Hintergrundfocuslevel“ bezeichnet. Gemittelt auf alle Patienten betrug dieses $0,048 \pm 0,04$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) und unterschied sich nicht wesentlich in beiden Gruppen (Gruppe I: $0,05 \pm 0,041$ [Mittelwert \pm Standardabweichung] Foci pro Zelle, Gruppe II: $0,046 \pm 0,04$ [Mittelwert \pm Standardabweichung] Foci pro Zelle). Um die ständig vorhandene Schädigung der DNA auszublenden und somit ausschließlich die Doppelstrangbrüche auf Grund der Computertomographie darzustellen, wurde das Hintergrundfocuslevel von allen anderen Untersuchungswerten subtrahiert (Darstellung in Tab. 6 sowie in Abb. 7).

Patienten	Foci 5 min post CT - Hintergrundfokuslevel	Foci 1 h post CT - Hintergrundfokuslevel	Foci 2 h post CT - Hintergrundfokuslevel	Foci 24 h post CT - Hintergrundfokuslevel
alle Patienten	0,153 ± 0,107	0,081 ± 0,07	0,053 ± 0,051	0,012 ± 0,042
Gruppe I	0,132 ± 0,084	0,073 ± 0,067	0,047 ± 0,062	0,011 ± 0,034
Gruppe II	0,17 ± 0,121	0,088 ± 0,071	0,058 ± 0,04	0,013 ± 0,048

Tab. 6: Ergebnisse nach Subtraktion des Hintergrundfokuslevels. Mittelwerte ± Standardabweichung der Mittelwerte.

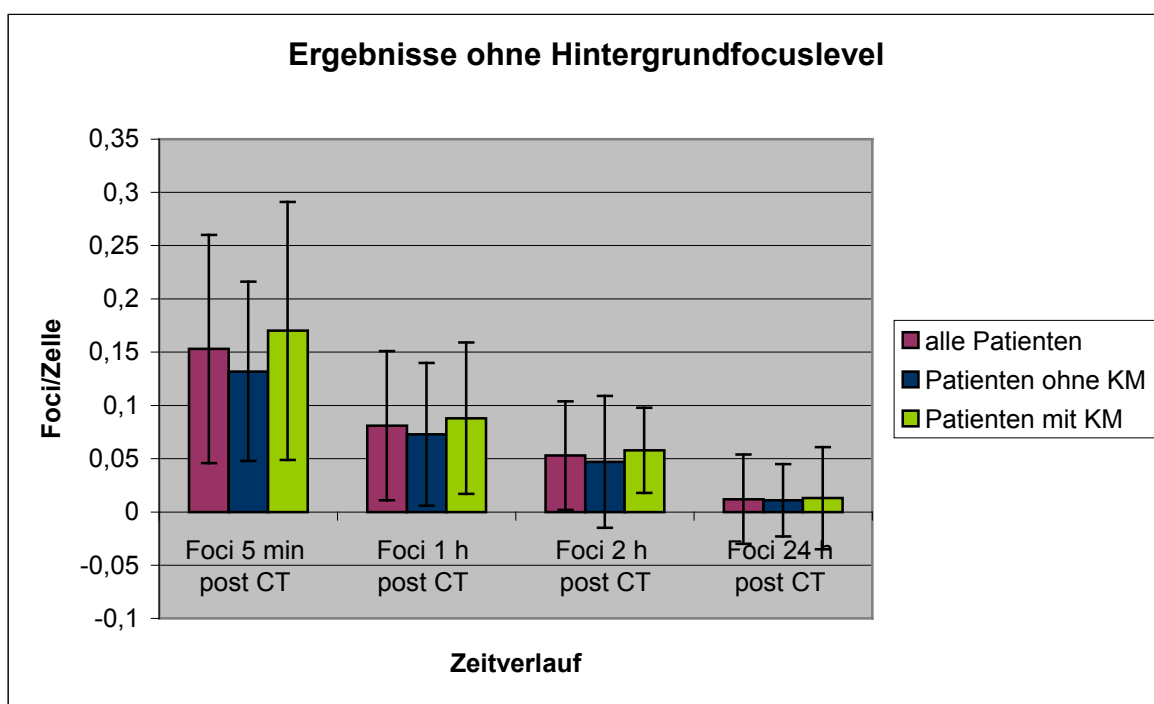


Abb. 7: Graphische Darstellung der Kinetik der γ -H2AX-Foci nach Subtraktion des Hintergrundfokuslevels. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte.

5 Diskussion

5.1 Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Computertomographie mittels der γ -H2AX-Methode

Diagnostische Röntgenuntersuchungen stellen die größte vom Menschen geschaffene Quelle für Strahlung und damit einhergehende DNA-Schäden im Alltag dar. Daher ist es für den Strahlenschutz von besonderem Interesse, mögliche gesundheitliche Folgen wie Krebs so exakt wie möglich abzuschätzen. Aus diesem Grund stellt die Untersuchung der Wirkung von ionisierender Strahlung im Niedrigdosisbereich in der Strahlenbiologie ein wichtiges Forschungsfeld dar und dessen Erkenntnisse werden in Zukunft Einfluss auf politische, ökologische sowie ökonomische Entscheidungen haben. Im Jahr 2006 wurden pro Einwohner in Deutschland 1,6 allgemeine Röntgenuntersuchungen durchgeführt. Deren kollektive effektive Dosis lag bei 1,8 mSV pro Einwohner. In der Trendanalyse des Bundesamtes für Strahlenschutz war die stetige Zunahme an Computertomographieuntersuchungen am auffallendsten. Deren Anzahl hat sich zwischen 1996 und 2006 nahezu verdoppelt und trotz ihres geringen Anteils an allen Untersuchungsarten von nur etwa 7% entfallen auf sie etwa 60% der kollektiven Gesamtdosis (Bundesamt für Strahlenschutz 2010). Diese Zahlen spiegeln den zunehmenden Einsatz neuer Techniken im klinischen Alltag wider und verdeutlichen damit die dringliche Notwendigkeit der Erforschung von zellulären Reaktionen auf Strahlendosen, wie sie im Rahmen von Computertomographieuntersuchungen appliziert werden. Bisherige Studien zu diesem Thema wurden vor allem *in vitro* durchgeführt oder weisen im Falle von *in vivo*-Untersuchungen nur sehr geringe Patientenzahlen auf (Rothkamm und Lobrich 2003; Lobrich *et al.* 2005; Rothkamm *et al.* 2007; Geisel *et al.* 2008; Grudzenski *et al.* 2009). Da bisher noch keine zuverlässigen Daten für das Krebsrisiko im Niedrigdosisbereich vorliegen, ist eine Untersuchung der Schäden auf DNA-Ebene *in vivo* von großem Interesse für eine verbesserte Risikoabschätzung.

5.1.1 Die γ -H2AX-Methode als valides Verfahren zur Bestimmung von Doppelstrangbrüchen in vivo

Ein einzelner Schaden der DNA in einer einzelnen Zelle aufgrund von Einwirkung ionisierender Strahlung kann zum Auslöser der Kanzerogenese werden (Rothkamm und Lobrich 2003). DNA-Doppelstrangbrüche sind die schwerwiegendsten Läsionen, die nach Bestrahlung auftreten können (Ward *et al.* 2003). Seit einigen Jahren wird γ H2AX als Marker für Doppelstrangbrüche herangezogen (Rogakou *et al.* 1998). Dieser Marker kann mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers in der Immunfluoreszenzmikroskopie in Form von deutlich sichtbaren Foci dargestellt werden. Dabei entspricht ein Focus genau einem DSB (Rothkamm und Lobrich 2003). In den letzten Jahren fand diese Methode auch in klinischen Studien Anwendung, da es als evident angesehen wird, dass sie Doppelstrangbrüche nach Einwirkung von ionisierender Strahlung zuverlässig und exakt quantifiziert (Pilch *et al.* 2003; Fernandez-Capetillo *et al.* 2004; Lobrich *et al.* 2005; Rothkamm *et al.* 2007; Geisel *et al.* 2008; Grudzinski *et al.* 2009). Löbrich *et al.* verwendeten in ihrer Studie von 2005 als Erste diese Methode, um DSBs nach Computertomographie in Lymphozyten nachzuweisen. Lymphozyten als Zellen zur Bestimmung von DSBs zu wählen, hat den Vorteil, dass man diese mittels Blutabnahme im Klinikalltag schnell und einfach akquirieren kann. Auf diese Weise entstand eine Methode, die es ermöglicht, biologisch relevante Dosisbereiche in vivo ohne große medizinische Interventionen untersuchen zu können (Lobrich *et al.* 2005). Ein Problem der Messung von DSBs in Lymphozyten in einer klinischen Studie mit CT-Patienten ist, dass während der Untersuchung nur ein Teil des Körpers und damit auch nur ein Teil der Lymphozyten bestrahlt wird. Nach Bestrahlung vermischen sich die bestrahlten Lymphozyten schnell mit unbestrahlten, sodass ein Verdünnungseffekt des aktuellen Schadenslevels entsteht, der zur Unterschätzung des Ergebnisses führt. Klinische Studien haben generell das Problem, dass Patienten in ihrem genetischen Hintergrund heterogen sind, was dazu führt, dass Ergebnisse sehr variabel sein können. Dies hat sich auch in dieser Arbeit gezeigt.

5.1.2 Die Induktion von Doppelstrangbrüchen nach Computertomographie

Nach Optimierung der γ -H2AX-Methode in unserem Labor bestimmten wir die Doppelstrangbruchanzahl mit Hilfe des γ -H2AX-Verfahrens von Lymphozyten bei 47 Patienten im zeitlichen Verlauf nach einer klinisch indizierten Computertomographieuntersuchung.

Die erste Blutentnahme erfolgte als Kontrolle vor der Computertomographieuntersuchung. Diese Kontrolle zeigt das Schadenslevel der DNA vor Röntgenstrahlenexposition und reflektiert das sogenannte „Hintergrundfocuslevel“, das die permanente Schädigung der DNA durch exogene sowie endogene Einflüsse darstellt. Gemittelt auf alle Patienten betrug dieses $0,048 \pm 0,04$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) und entspricht damit dem Wert, den auch Rothkamm und Löbrich 2003 in ihrer Studie ermittelt haben (0,05 Foci pro Zelle). Dies bedeutet, dass natürlicherweise eine von zwanzig Zellen einen Focus und damit einen Doppelstrangbruch aufweist.

Die zweite Blutabnahme erfolgte 5 min nach der Computertomographieuntersuchung. Der Anstieg der Focusanzahl auf $0,201 \pm 0,108$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Foci pro Zelle nach Kontakt des Blutes mit Röntgenstrahlen entspricht einer Zunahme der Doppelstrangbrüche um den Faktor 4,2. Damit kann in dieser Arbeit bestätigt werden, dass Computertomographieuntersuchungen deutliche DNA-Schäden in Form von DSBs induzieren und diese mit Hilfe der γ -H2AX-Methode erfolgreich detektiert werden können. Die ermittelte Focusanzahl entspricht Ergebnissen anderer Studien. Geisel *et al.* veröffentlichten in ihrer Studie von 2008 einen durchschnittlichen Focuswert von $0,217 \pm 0,147$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Foci pro Zelle 5 min nach Computertomographie. Die etwas neuere Arbeit von Grudzinski *et al.* von 2009 ermittelte 30 min post CT Focuswerte zwischen 0,1 und 0,22 Foci pro Zelle. Das durchschnittliche Dosislängenprodukt (DLP) aller Untersuchungen der vorliegenden Arbeit belief sich auf 528 mGy·cm. Rechnet man die Focuswerte auf eine Dosis von 1000 mGy·cm hoch, dann ergibt sich ein Faktor von 7,9. Dies entspricht auch den Resultaten von Rothkamm *et al.* aus dem Jahre 2007, die in ihrer Studie mit 13 Patienten nach Computertomographie eine Faktorerhöhung von 8 bis 10 beobachteten. In dieser Studie wurde auch festge-

stellt, dass das höchste Schadensniveau bereits 5 min nach der Bestrahlung erreicht wird. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Herz pro Minute etwa 5 Liter Blut durch den Körper pumpt und damit ein großer Anteil der Blutzellen mit der Strahlung in Berührung kommt, je nachdem, wie groß die bestrahlte Körperoberfläche ist und wie lange die Röntgenstrahlenexposition andauert. Durch die hohe Arbeitsleistung des Herzens sind die bestrahlten und unbestrahlten Lymphozyten nach 5 min gut durchmischt und die maximale Anzahl der γ -H2AX-Foci kann bei den Zellen dieses Blutabnahmezeitpunktes detektiert werden. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit bestätigen das, denn die Focusanzahl des folgenden Blutabnahmezeitpunktes 1 h nach Computertomographie ist schon deutlich gesunken und reflektiert den beginnenden Reparaturprozess.

5.1.3 Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen nach Computertomographie

Beginnend mit der Blutabnahme 1 h nach der CT-Untersuchung nahm die durchschnittliche Anzahl der γ -H2AX-Foci ab. Sie verringerte sich zu diesem Zeitpunkt um 30% auf $70\% \pm 21\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung), eine Stunde später um weitere 16%, so dass 2 h nach der Computertomographie noch $54\% \pm 24\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Doppelstrangbrüche bestanden. Die Abnahme der Focuswerte entspricht der Reparatur der Doppelstrangbrüche (Rothkamm und Löbrich 2003). Diese Reparaturkinetik korreliert mit der oben erwähnten ähnlichen Studien (Geisel *et al.* 2008; Grudzenski 2009).

Innerhalb von 24 h wurden $65\% \pm 36\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) der induzierten Doppelstrangbrüche repariert. Damit lagen die Foci 25% über dem vor der Strahlenexposition bestimmten Hintergrundfocuslevel. Die Messung dieser residualen Focusanzahl besagt, dass 24 h nach Induktion der DSBs keine komplette Reparatur stattfand. Unser Befund unterstützt die Resultate von Rothkamm und Löbrich aus dem Jahre 2003, einer *in vitro*-Studie, die sich mit der Reparatur von Doppelstrangbrüchen in konfluenten Fibroblasten nach niedrigen Dosen beschäftigte. In jener Studie wurde

gezeigt, dass durch niedrige Strahlendosen die Reparaturkapazität nachlässt und im Bereich weniger mGy, des für die Röntgendiagnostik relevanten Dosisbereiches, nahezu keine Reparatur mehr stattfindet und somit verursachte DSBs für einige Tage unrepariert bleiben.

Dies korreliert nicht mit der Aussage anderer Studien. Löbrich *et al.* 2005 und Geisel *et al.* 2008 berichten von einer fast vollständigen Reparatur nach 24 h. Dabei stimmen die 24 h-Werte der vorliegenden Arbeit mit denen von Geisel *et al.* fast überein. Auch das Dosislängenprodukt ist ähnlich. Geisel *et al.* ermittelten eine mittlere Focuszahl pro Zelle von $0,067 \pm 0,013$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) nach 24 h. Der Wert zum gleichen Zeitpunkt betrug in der vorliegenden Studie $0,06 \pm 0,046$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Foci pro Zelle. Dass Geisel *et al.* nur $6\% \pm 18\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) mehr Foci als vor der Röntgenstrahlenexposition verzeichneten, lag an deren höherem Hintergrundfocuslevel von $0,063 \pm 0,007$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). Zu beachten ist auch die unterschiedliche Studiengröße. Geisel *et al.* untersuchten nur 5 CT-Patienten, die vorliegende Studie dagegen 47. In Anbetracht der geringen Größenordnung der Focuswerte reicht die Patientenzahl dieser Studie immer noch nicht aus, um eine valide Aussage zur Reparaturkapazität treffen zu können. Zukünftige Studien sollten eine größere Anzahl von Patienten einbeziehen, da sonst einzelne Werte einen zu großen Einfluss auf das Gesamtergebnis haben. In dieser Studie hatten 29 von 47 Patienten nach 24 h höhere Focuswerte als vor Röntgenexposition, wobei der Unterschied zum Hintergrundfocuslevel in den meisten Fällen nur minimal und nur in etwa 10% der Fälle deutlich erhöht war. Löbrich *et al.* berichten in ihrer Studie aus dem Jahre 2005 von einem Patienten, der eine erhöhte Radiosensitivität aufwies und schätzen in ihrem Paper aus dem Jahre 2006, dass etwa 10% aller Patienten davon betroffen sind. Eine genetisch bedingte, erhöhte Radiosensitivität äußert sich in höheren Focuswerten und residualen Foci, die eine unvollständige Reparatur der Doppelstrangbrüche repräsentieren (Löbrich *et al.* 2005; Löbrich und Kiefer 2006). Möglicherweise weisen auch einige Patienten dieser Arbeit eine erhöhte Radiosensitivität auf. Es wäre interessant, in Zukunft auffällige Patienten daraufhin genauer zu untersuchen, um gegebenenfalls in solchen Fällen die Indikation zur Strahlenexposition strenger zu stellen. Dazu würde sich die γ -H2AX-Methode eignen (Löbrich und Kiefer

2006). In zukünftigen Studien zu diesem Thema sollte darauf geachtet werden, Patienten mit möglichst gleichen Vorerkrankungen zu untersuchen, um diesen eventuellen Bias auszuschließen.

Auffällig war, dass alle Ergebnisse dieser Arbeit eine hohe Standardabweichung zeigten. Das signalisiert, dass die Werte zwischen den Patienten stark streuen. Ein Teil der vorliegenden Literatur unterstützt dies (Ismail *et al.* 2007; Grudzenski *et al.* 2009). Es findet sich bei in vivo-Untersuchungen eine hohe interindividuelle Variation in der Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen nach Röntgenstrahlenexposition durch Computertomographie. Dafür gibt es verschiedene mögliche Erklärungen. Da zur Untersuchung der DSBs Lymphozyten verwendet wurden und bei jeder CT-Untersuchung die Länge des abgescannten Körpers variiert, würde eine große Varianz in der abgescannten Körperlänge bewirken, dass ein größeres oder kleineres Blutvolumen bestrahlt wird und damit mehr oder weniger Lymphozyten Doppelstrangbrüche aufweisen. Die recht große Varianz des Dosislängenproduktes (DLP) im Rahmen dieser Studie würde diese These stützen und für zukünftige Studien implizieren, dass das DLP einheitlich gewählt werden sollte. Eine weitere Ursache für die Divergenz der Werte kann allgemein ein verschieden großes Blutvolumen im Untersuchungsbereich während der Bestrahlung sein, welches das Verdünnungsverhältnis zwischen bestrahlten und unbestrahlten Lymphozyten beeinflusst (Grudzenski 2009). Ein genetisch bedingtes, unterschiedlich ausgeprägtes Ansprechen auf Strahlenexposition sowie Reparaturvermögen können ebenfalls Ursachen der großen Varianz der Focuswerte sein. Ismail *et al.* (2007) unterstützen diese Ansicht. Sie gehen beim Menschen von vererbten Unterschieden im γ H2AX-Signal aus. Das Signal könnte z.B. dahingehend differieren, dass bei einem bestimmten DNA-Schaden die Anzahl an induzierten γ -H2AX-Foci zwischen Individuen variiert. Das würde implizieren, dass Zellen verschiedener Menschen nicht die gleiche Effektivität bei der Umsetzung von Doppelstrangbrüchen in das γ H2AX-Signal besitzen. Da erwiesen wurde, dass die Anzahl von γ -H2AX-Foci gut mit der von vorhandenen Doppelstrangbrüchen korreliert, ist diese These eher unwahrscheinlich. Es gilt, in Zukunft die zugrundeliegenden Mechanismen der γ H2AX-Signalvariation zu erforschen. Interessant wäre dabei auch, ob ein Zusammenhang mit Radiosensitivität besteht.

5.2 Auswirkung von Kontrastmittel auf die Entstehung von Doppelstrangbrüchen nach Computertomographie

Aufgrund der zunehmenden Erkenntnisse im Bereich der Strahlenbiologie ist man gegenwärtig bestrebt, die Strahlenexposition bei radiologischen Untersuchungen so gering wie möglich zu halten. Gleichzeitig werden jedoch gerade bei Computertomographieuntersuchungen vor der Bestrahlung häufig Kontrastmittel injiziert, die durch eine erhöhte Strahlenabsorption die Bildgebung unterstützen. Seit mehreren Jahrzehnten wird beobachtet, dass die Anwendung von KM nach Bestrahlung vermehrt DNA-Schäden zur Folge hat. Die genaue Ursache ist bis heute unklar. Eine mögliche Erklärung ist ein gesteigerter Photoeffekt, der durch die im KM enthaltenen Elemente mit hoher Ordnungszahl (Z) verursacht wird (Callisen *et al.* 1979; Hadnagy *et al.* 1982; Boudou *et al.* 2007). Als eine weitere mögliche Ursache wird eine potentielle Beeinträchtigung des Reparaturvermögens durch Spaltprodukte des Kontrastmittels, die während der Bestrahlung entstehen, angesehen (Joubert *et al.* 2005). Parvez *et al.* (1987) dagegen vertreten die Ansicht, dass Kontrastmittel an sich zytotoxische Effekte besitzt.

Wie groß der Schaden durch Kontrastmittelapplikation im Rahmen der Computertomographie ist, wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der γ -H2AX-Methode untersucht. Es wurden zwei Patientengruppen gebildet. Gruppe I bestand aus 21 Patienten, die ausschließlich native Computertomographien erhielten. In Gruppe II befanden sich 26 Patienten, die im Rahmen ihrer CT-Untersuchung Kontrastmittel appliziert bekamen. Bei allen Patienten wurde die Focuszahl der Lymphozyten untersucht, um die entstandenen Doppelstrangbrüche zu quantifizieren und zu vergleichen.

Durch die Zugabe von Kontrastmittel in Gruppe II kam es 5 min nach Computertomographie zu einer sichtbaren Erhöhung der Anzahl an induzierten Doppelstrangbrüchen. Die beobachtete Erhöhung der DSB-Anzahl durch den KM-Effekt betrug durchschnittlich 29%. Die Differenz der um das Hintergrundfocuslevel bereinigten Mittelwerte beider Gruppen ergab 0,038 Foci pro Zelle, so dass durch KM-Gabe ca. jede 26. Zelle einen Doppelstrangbruch mehr besitzt als ohne Kontrastmittelgabe. Um den Kontrastmitteleinfluss definitiv beweisen zu können, sollte in Zukunft angesichts der kleinen Größenordnung in den Differenzen der Focuszahlen eine größere Patientenzahl unter-

sucht werden. Andere Arbeitsgruppen kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Ein zusätzlicher Doppelstrangbruch jeder 26. Zelle mag gering erscheinen, bezogen auf die Gesamtbevölkerung aber ein Gesundheitsproblem darstellen, da jeder falsch oder nicht reparierte Doppelstrangbruch ein Krebsrisiko in sich birgt.

Das vorliegende Ergebnis korreliert mit denen früherer Studien. Matsubara *et al.* 1982 untersuchten den Effekt von jodhaltigem Kontrastmittel auf die Entstehung von Chromosomenaberrationen in Lymphozyten *in vitro*. In Anwesenheit von KM kam es zu einer Erhöhung der Anzahl an Chromosomen- und Chromatidaberrationen, die mit ansteigender Kontrastmittelkonzentration zunahm. Hadagny *et al.* fanden in ihrer *in vitro*-Studie aus dem Jahre 1982 nach Bestrahlung in Anwesenheit von jodhaltigem Kontrastmittel ebenso eine Zunahme chromosomaler Aberrationen in Lymphozyten. Grudzenski *et al.* publizierten 2009 einen Zuwachs an Doppelstrangbrüchen in Lymphozyten *in vivo* von 30% nach Kontrastmittelapplikation bei CT-Untersuchungen.

Das vermehrte Auftreten von Doppelstrangbrüchen in Anwesenheit von jodhaltigem Kontrastmittel könnte auf der Verstärkung des Photoeffektes durch die im KM enthaltenen Jodatome basieren. Die im Kontrastmittel enthaltenen Jodatome besitzen eine hohe Ordnungszahl (Z) und erhöhen im Zellmedium auf diese Weise die mittlere Ordnungszahl. Die Absorption von Strahlung ist direkt proportional zur Ordnungszahl und der Photoeffekt ist im Gegensatz zum Comptoneffekt sehr von Z abhängig. Durch die erhöhte Ordnungszahl (Z) entstehen vermehrt Photoelektronen, die nun ihrerseits Materie anregen und ionisieren. Dabei werden v.a. über die Radiolyse des Wassers Radikale erzeugt, die über eine Radikalkettenreaktion zu einer DNA-Schädigung in Form von Doppelstrangbrüchen führen (Kauffmann *et al.* 2006; Jost *et al.* 2009).

In beiden Patientengruppen fanden sich hohe Werte in der Standardabweichung, die in Gruppe II sogar geringfügig höher waren. Dies repräsentiert die großen interindividuellen Schwankungen in der Anzahl der Doppelstrangbrüche. Ursache der großen interindividuellen Schwankungen im Kontrastmitteleffekt könnten die individuell unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten des Blutes sein. Durch letzteres ist das kontrastierte Blut zur Bestrahlung unterschiedlich im Körper verteilt und der Kontakt mit der Menge des kontrastierten Blutes mit der Röntgenstrahlung variiert. Außerdem kann es

aufgrund minimaler Verzögerungen zwischen Kontrastmittelgabe und Bestrahlung zu einem Absinken der KM-Konzentration im bestrahlten Bereich des Patienten kommen. Um die maximal mögliche Kontrastmittelkonzentration im bestrahlten Areal des Patienten zu erzielen, muss der Zeitpunkt der Bestrahlung zeitlich sehr eng mit der Kontrastmittelinjektion verknüpft sein, da die maximale Jodkonzentration schon nach 15 bis 22 s in der Aorta erreicht wird (Prokop *et al.* 2003). Beginnt die CT-Untersuchung etwas später, dann sinkt die Jodkonzentration im bestrahlten Bereich ab, wodurch auch der Kontrastmitteleffekt geringer ausfällt (Grudzenski 2009).

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit beobachtet werden, dass die Applikation von jodhaltigem Kontrastmittel bei Computertomographie zu einer sichtbaren Erhöhung der Anzahl an induzierten Doppelstrangbrüchen führt. Dies impliziert, dass die Gabe von Kontrastmitteln zur Strahlenexposition von Patienten beiträgt und bei Röntgenuntersuchungen berücksichtigt werden sollte. Es gilt, bei der Anwendung von KM nicht nur auf die Verträglichkeit zu achten, sondern auch die möglichen Langzeitfolgen vor Augen zu haben. Dementsprechend sollte die Dosierung der Kontrastmittel dem verwendeten Röntgengerät angepasst werden, um eine unnötige Strahlenexposition zu vermeiden.

5.3 Auswirkung von Kontrastmittel auf die Reparaturkinetik der Doppelstrangbrüche

Nachdem es durch die Applikation von Kontrastmittel bei Computertomographie zu einer initialen Erhöhung an Doppelstrangbrüchen kam, wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung des KMs auf die Doppelstrangbruchreparatur untersucht.

Die Kinetik der Abnahme der Foci war in beiden Patientengruppen (Gruppe I mit nativen CTs und Gruppe II mit KM-Applikation) vergleichbar. 1 h nach CT bestanden in Gruppe I noch $71\% \pm 20\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Foci pro Zelle berechnet auf 5 min nach CT und in Gruppe II noch $70\% \pm 21\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). 2 h nach der Untersuchung waren in Gruppe I weiterhin $53\% \pm 16\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) der ursprünglich induzierten Foci vorhanden, in Gruppe II zum gleichen Zeitpunkt noch $55\% \pm 28\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Innerhalb von 24 h verringerte sich in Gruppe I die Anzahl der Doppelstrangbrüche auf $35\% \pm 19\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung), in Gruppe II auf $36\% \pm 46\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). Im Vergleich zu dem vor der Strahlenexposition gemessenen Hintergrundfocuslevel lagen die Werte in Gruppe I 22% und in Gruppe II 27% über den Ausgangswerten.

Diese Abnahme der Focuswerte entspricht der Reparatur der Doppelstrangbrüche (Rothkamm und Lobrich 2003) und zeigt, dass Kontrastmittel nur einen unerheblichen Einfluss auf die Reparaturkapazität hat. Auch wenn durch KM initial mehr DSBs entstehen, so bleiben nach 24 h annähernd gleiche Focuswerte bestehen. Die zusätzlichen DSBs wurden demnach effektiv repariert. Dass beide Gruppen 24 h nach Induktion der DSBs residuale Focuszahlen aufwiesen, besagt, dass keine komplette Reparatur stattfand. Aufgrund der zu geringen Patientenzahl dieser Studie sollte dies in Zukunft an einer größeren Probandenzahl erneut überprüft werden. Leider wurden im Rahmen dieser Studie keine späteren Blutabnahmen vorgenommen. Zukünftige Studien sollten klären, in welchem Zeitraum nach Computertomographieuntersuchungen die residuellen Doppelstrangbrüche repariert werden, so dass das Hintergrundfocuslevel wieder erreicht wird. Die bislang einzig vorliegende Arbeit zum Einfluss von KM auf DSBs bei Computertomographieuntersuchungen stellte ebenso fest, dass die Zugabe von Kontrastmittel nach Bestrahlung nicht die Reparatur beeinträchtigt (Grudzenski *et al.* 2009).

Auffällig war wieder die hohe Standardabweichung, die in Gruppe II zum Teil erheblich höher war als in Gruppe I und schon bei der Induktion der Doppelstrangbrüche beschrieben wurde. Sie repräsentiert die große Streuung der Focuswerte zwischen den Patienten. Der Hintergrund dieser interindividuellen Unterschiede ist bisher noch nicht geklärt. Mögliche Ursachen wurden weiter oben schon beschrieben. Dabei ist ein Aspekt noch nicht berücksichtigt worden. Einige Studien weisen darauf hin, dass das Alter, das in dieser Studie variierte, einen Einfluss auf die Reaktion des Organismus auf Strahlen hat (Mayer *et al.* 1989; Seluanov *et al.* 2004; Grudzenski *et al.* 2009). Diese Arbeiten beobachteten, dass die DSB-Reparaturkapazität mit zunehmendem Alter schlechter wird. Das könnte auch ein Grund dafür sein, dass Krebserkrankungen mit

dem Alter an Häufigkeit zunehmen. Mögliche Erklärungen könnten ein nachlassendes Phosphorylierungsvermögen von H2AX im Alter und damit eine nachlassende Schadenserkennung sein. Die Ursache könnte aber auch im Nachlassen der Reparaturkapazität liegen. Dazu wird in der Literatur diskutiert, ob mit zunehmendem Alter die Effizienz des Nichthomologen Endjoining nachlässt (Seluanov *et al.* 2004; Vyjayanti und Rao 2006). Um in zukünftigen Studien Alter als Bias auszuschließen, sollte die Altersstruktur der zu vergleichenden Patientengruppen homogen sein.

5.4 Ausblick

Die hier verwendete γ -H2AX-Methode erwies sich als ein geeignetes und sehr sensitives Verfahren, um die Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen nach Computertomographie zu evaluieren und den Einfluss von Kontrastmittelapplikation zu untersuchen.

Mit Hilfe dieser Methode konnte gezeigt werden, dass Computertomographieuntersuchungen *in vivo* deutliche Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen induzieren und diese repariert werden. Anders als dies in einigen vorausgehenden Studien publiziert worden ist (Lobrich *et al.* 2005; Geisel *et al.* 2008; Grudzinski *et al.* 2009), kam es in dieser Arbeit nach 24 h nicht zu einer vollständigen Reparatur.

Der besondere Aspekt dieser Studie war die Untersuchung des Einflusses von Kontrastmittel auf die Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Unsere Daten lassen darauf schließen, dass Kontrastmittel bei Computertomographieuntersuchungen die Entstehung von DNA-Schäden fördert und aus diesem Grund bei der Kalkulation der Strahlenexposition durch Computertomographie mit berücksichtigt werden muss. Es wirkt sich aber nicht negativ auf die Reparatur der DSBs auf.

Die Eignung der γ -H2AX-Methode als biologisches Dosimeter kann in dieser Arbeit bestätigt werden. Auch andere Arbeiten haben schon auf das Potenzial dieser Methode aufmerksam gemacht (Lobrich *et al.* 2005; Lobrich und Kiefer 2006; Ismail *et al.* 2007; Rothkamm *et al.* 2007; Geisel *et al.* 2008; Grudzinski *et al.* 2009). Löbrich *et al.* wiesen in ihren Papern von 2005 und 2006 darauf hin, dass radiosensitive Patienten damit detektiert werden könnten und sahen sie als wertvolles biologisches Dosimeter bei

radiodiagnostischen Untersuchungen an. Als weitere nützliche Anwendung der Methode nannten sie die Strahlentherapie. Die individuelle Reparaturkapazität von Krebspatienten könnte im Voraus untersucht werden, um somit die individuell optimale Dosis zu finden. Ismail *et al.* machten 2007 darauf aufmerksam, dass mit Hilfe der γ -H2AX-Foci auch DNA-schädigende Medikamente untersucht werden könnten. Sie wiesen darauf hin, dass die klinischen Effekte von Doppelstrangbrüchen auf Individuen durch DSB-induzierende Stoffe in großem Maße variieren. Aus diesem Grund kann z.B. die gleiche Röntgendosis bei einigen Krebspatienten schwerwiegende Nebenwirkungen auslösen, während bei anderen Patienten keine Auswirkungen der applizierten Dosis auftreten. Ihrer Meinung nach eignet sich die γ -H2AX-Methode, um dies zu detektieren und mit Hilfe der individuellen DNA-Schadensantwort die bestmögliche Dosis für jeden Patienten zu finden. Um die γ -H2AX-Methode als objektive Methode zu etablieren, sollten bei der Auszählung der Foci standardmäßig Computerprogramme genutzt werden (Bhagal *et al.* 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden die Foci ohne Computerprogramm ausgezählt. Dies kann trotz Verblindung zu systematischen Fehlern führen und könnte Ergebnisse verfälscht haben.

Möglicherweise zeigen Studien in Zukunft, dass bei der DNA-Schädigung im Niedrigdosisbereich *in vivo* noch weitere Effekte als die bloße Kumulation der Strahlendosis bedacht werden müssen. Einige radiobiologische Phänomene zu diesem Thema wurden schon in der Literatur beschrieben, bisher ist allerdings noch nicht deren Signifikanz *in vivo* erforscht. Dazu gehören z.B. der Bystander-Effekt, bei dem Signale der DNA-Schädigung bestrahlter Zellen weitergeleitet werden und auf diese Weise die benachbarten unbestrahlten Zellen Schäden zeigen (Rothkamm und Lobrich 2003) oder die „low dose hypersensitivity“, bei der Zellen in der G2-Phase bei niedrigen Dosen eine über das erwartete Maß gesteigerte Radiosensitivität aufweisen (Joiner *et al.* 2001). Es gilt zu untersuchen, ob diese und ähnliche Effekte einen Einfluss bei der Krebsentstehung nach Niedrigdosisbestrahlung haben.

In dieser Arbeit geben die residualen Focuslevel nach 24 h Anstoß, in Zukunft Reparaturzeiten über 24 h hinaus zu untersuchen. Langfristig gilt es zu erforschen, welche Faktoren bei der Reparatur residualer Brüche eine Rolle spielen und welche Auswirkungen Doppelstrangbrüche, die über längere Zeit unrepariert verbleiben, auf den Or-

ganismus haben. Demzufolge bliebe zu untersuchen, ob diese Doppelstrangbrüche letztendlich zur Entartung von Zellen beitragen.

Viele Aspekte der Schädigung und Reparatur der DNA, auch im Zusammenhang mit der Kanzerogenese, sind bisher noch unbekannt oder nur teilweise verstanden. Hier sollte weitere Grundlagenforschung betrieben werden. Es gibt aber auch Bedarf für weiterführende in vivo Studien. Diese Arbeit ist als präliminäre Studie angelegt und könnte als Anregung für eine erneute Studie zum gleichen Thema dienen, um mit Hilfe größerer Patientenzahlen endgültig die Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen nach Computertomographie und dabei vor allem die Frage des Kontrastmitteleffektes zu klären. Um objektive Aussagen treffen zu können, sollte bei den Patientengruppen darauf geachtet werden, dass sie die gleiche Altersstruktur, das gleiche Geschlecht, die gleichen klinischen Vorerkrankungen, die gleiche CT-Untersuchung mit ähnlichen DLP-Werten und die gleiche verabreichte Kontrastmittelmenge aufweisen. Allerdings ist bisher nicht bekannt, inwiefern die genannten Merkmale die Ergebnisse beeinflussen. Auch diese Aspekte könnten in zukünftigen Studien untersucht werden.

Literaturverzeichnis

Adams, F. H., Norman, A., Bass, D. und Oku, G., "Chromosome damage in infants and children after cardiac catheterization and angiocardiography," *Pediatrics*, 1978, 312-6.

Bakkenist, Christopher J. und Kastan, Michael B., "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation," *Nature*, 2003, 499-506.

Bekker-Jensen, Simon, Lukas, Claudia, Kitagawa, Risa et al., "Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks," *The Journal of cell biology*, 2006, 195-206.

Bhogal, Nirmal, Jalali, Farid und Bristow, Robert G., "Microscopic imaging of DNA repair foci in irradiated normal tissues," *International journal of radiation biology*, 2009, 732-46.

Biba, Franz, "Johann Radon und die CT," *Österreichische Apotheker Zeitung*, 2006, 1202-1203.

Birren, B. W., Lai, E., Clark, S. M., Hood, L. und Simon, M. I., "Optimized conditions for pulsed field gel electrophoretic separations of DNA," *Nucleic acids research*, 1988, 7563-82.

Boudou, C., Tropres, I., Rousseau, J. et al., "Polymer gel dosimetry for synchrotron stereotactic radiotherapy and iodine dose-enhancement measurements," *Physics in medicine and biology*, 2007, 4881-92.

Brenner, David J., Doll, Richard, Goodhead, Dudley T. et al., "Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 13761-6.

Bundesamt für Strahlenschutz, *Strahlenexposition durch medizinische Maßnahmen* (<http://www.bfs.de/de/ion/medizin/Medizin.pdf>).

Callisen, H. H., Norman, A. und Adams, F. H., "Absorbed dose in the presence of con-

- trast agents during pediatric cardiac catheterization," *Medical physics*, 1979, 504-9.
- Christiansen, C., Pichler, W. J. und Skotland, T.**, "Delayed allergy-like reactions to X-ray contrast media: mechanistic considerations," Band 10 2000, 1965-75.
- Clement, Olivier, Robert, Philippe, Cuenod, Charles A. et al.**, "Functional imaging of tumors using CT and iodinated contrast media of different molecular weights," *Academic radiology*, 2002, S212-4.
- Cochran, S. T., Khodadoust, A. und Norman, A.**, "Cytogenetic effects of contrast material in patients undergoing excretory urography," *Radiology*, 1980, 43-6.
- Dropkin, Greg**, "Low dose radiation and cancer in A-bomb survivors: latency and non-linear dose-response in the 1950-90 mortality cohort," *Environmental health : a global access science source*, 2007, 1.
- Elke, Manfred und Schmitt, Hans-Erich**, *Kontrastmittel in der radiologischen Diagnostik- Eigenschaften - Nebenwirkungen - Behandlung*, Stuttgart [u.a.]: Thieme, 1992.
- Emminger, Hamid und Benz, Christian**, *Physikum exakt- das gesamte Prüfungswissen für die 1. ÄP ; 199 Tabellen ; [Medi-Learn Gütesiegel]*, Stuttgart: Thieme, 2005.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L. und O'Neill, K. L.**, "The comet assay: a comprehensive review," *Mutation research*, 1995, 37-59.
- Feinendegen, L. E.**, "Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis," *The British journal of radiology*, 2005, 3-7.
- Fernandez-Capetillo, Oscar, Lee, Alicia, Nussenzweig, Michel und Nussenzweig, Andre**, "H2AX: the histone guardian of the genome," *DNA repair*, 2004, 959-67.
- Geisel, Dominik, Heverhagen, Johannes T., Kalinowski, Marc und Wagner, Hans-Joachim**, "DNA double-strand breaks after percutaneous transluminal angioplasty," *Radiology*, 2008, 852-9.
- Grudzenski, Saskia, Kuefner, Michael A., Heckmann, Martina B., Uder, Michael und**

- Lobrich, Markus**, "Contrast medium-enhanced radiation damage caused by CT examinations," *Radiology*, 2009, 706-14.
- Grudzenski, Saskia**, *Einfluss von Kontrastmittel und der applizierten Röntgendosis auf die Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen*, 2009.
- Hadnagy, W., Stephan, G. und Kossel, F.**, "Enhanced yield of chromosomal aberrations in human peripheral lymphocytes in vitro using contrast media in X-irradiation," *Mutation research*, 1982, 249-54.
- Hall, Eric J. und Giaccia, Amato J.**, *Radiobiology for the radiologist*, Philadelphia: Lippincott Williams und Wilkins, 2006.
- Helleday, Thomas, Lo, Justin, van Gent, Dik C. und Engelward, Bevin P.**, "DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment," *DNA repair*, 2007, 923-35.
- Hewitson, Tim D., Bisucci, Teresa und Darby, Ian A.**, "Histochemical localization of apoptosis with in situ labeling of fragmented DNA," *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2006, 227-34.
- Ismail, Ismail Hassan, Wadhra, Tabasum Imran und Hammarsten, Ola**, "An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans," *Nucleic acids research*, 2007, e36.
- Jeggo, P. A. und Lobrich, M.**, *DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact?*, 2007.
- Johnson, R. T. und Rao, P. N.**, "Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei," *Nature*, 1970, 717-22.
- Joiner, M. C., Marples, B., Lambin, P., Short, S. C. und Turesson, I.**, "Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms," *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 2001a, 379-89.
- Joiner, M. C., Marples, B., Lambin, P., Short, S. C. und Turesson, I.**, "Low-dose hyper-

sensitivity: current status and possible mechanisms," *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 2001b, 379-89.

Jost, G., Golfier, S., Pietsch, H. et al., "The influence of x-ray contrast agents in computed tomography on the induction of dicentric and gamma-H2AX foci in lymphocytes of human blood samples," *Physics in medicine and biology*, 2009, 6029-39.

Joubert, Aurelie, Biston, Marie-Claude, Boudou, Caroline et al., "Irradiation in presence of iodinated contrast agent results in radiosensitization of endothelial cells: consequences for computed tomography therapy," *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 2005, 1486-96.

Kauffmann, Günter W., Moser, Ernst, Sauer, Rolf et al., *Radiologie- mit 115 Tabellen ; Fragen und Antworten ; [inkl. CD-ROM Das Gehirn im NMR-Bild] ; [Online-Zugang + interaktive Extras www.studentconsult.de]*, München [u.a.]: Elsevier, Urban und Fischer, 2006.

Khanna, K. K. und Jackson, S. P., "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection," *Nature genetics*, 2001, 247-54.

Kiefer, Jürgen und Kiefer, Ingmar, *Allgemeine Radiologie- Strahlenanwendung - Strahlenwirkung - Strahlenschutz*, Berlin [u.a.]: Parey, 2003.

Knollmann, Friedrich, Coakley, Fergus V., Denecke, Timm et al., *Mehrzeilen-CT- klinische Anwendung und Protokolle*, München [u.a.]: Elsevier, Urban und Fischer, 2006.

Kopp, A. F., Mortelet, K. J., Cho, Y. D. et al., "Prevalence of acute reactions to iopromide: postmarketing surveillance study of 74,717 patients," *Acta radiologica (Stockholm, Sweden : 1987)*, 2008, 902-11.

Kuefner, Michael A., Heinrich, Marc, Bautz, Werner und Uder, Michael, "Empfehlungen zur Prophylaxe der Nebenwirkungen bei intravasaler Applikation jodhaltiger Kontrastmittel. Suggestions for prevention of adverse reactions after intravascular administration of iodinated contrast media," *Röntgenpraxis; Zeitschrift für ra-*

diologische Technik, 2008, 199-206.

Kurz, Ebba U. und Lees-Miller, Susan P., "DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways," *DNA repair*, 2004, 889-900.

Lehnertz, K., *Röntgen Computertomographie (CT)* (epileptologie-bonn.de/cms/upload/homepage/lehnertz/CT1.pdf).

Lobrich, Markus und Kiefer, Jurgen, "Assessing the likelihood of severe side effects in radiotherapy," *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 2006, 2652-6.

Lobrich, Markus, Rief, Nicole, Kuhne, Martin et al., "In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 8984-9.

Matsubara, S., Suzuki, S., Suzuki, H., Kuwabara, Y. und Okano, T., "Effects of contrast medium on radiation-induced chromosome aberrations," *Radiology*, 1982, 295-301.

Matsudaira, H., Ueno, A. M. und Furuno, I., "Iodine contrast medium sensitizes cultured mammalian cells to X rays but not to gamma rays," *Radiation research*, 1980, 144-8.

Mayer, P. J., Lange, C. S., Bradley, M. O. und Nichols, W. W., "Age-dependent decline in rejoining of X-ray-induced DNA double-strand breaks in normal human lymphocytes," *Mutation research*, 1989, 95-100.

Mozdarani, H. und Fadaei, S., "Similar cytogenetic effects of sodium-meglumine diatrizoate and sodium-meglumine ioxithalamate in lymphocytes of patients undergoing brain CT scan," *Toxicology letters*, 1998, 25-30.

Norman, A., Adams, F. H. und Riley, R. F., "Cytogenetic effects of contrast media and triiodobenzoic acid derivatives in human lymphocytes," *Radiology*, 1978, 199-203.

- Pardo, B., Gomez-Gonzalez, B. und Aguilera, A.,** "DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship," *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2009, 1039-56.
- Parvez, Z., Korman, M., Satokari, K., Moncada, R. und Eklund, R.,** "Induction of mitotic micronuclei by X-ray contrast media in human peripheral lymphocytes," *Mutation research*, 1987, 233-9.
- Pilch, Duane R., Sedelnikova, Olga A., Redon, Christophe et al.,** "Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites," *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 2003, 123-9.
- Preston, R. Julian,** "The LNT model is the best we can do--today," *Journal of radiological protection : official journal of the Society for Radiological Protection*, 2003, 263-8.
- Prokop, Mathias, Galanski, Michael, Engelke, Christoph et al.,** *Spiral and multislice computed tomography of the body- 332 tables*, Stuttgart [u.a.]: Thieme, 2003.
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. und Bonner, W. M.,** "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo," *The Journal of cell biology*, 1999, 905-16.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. und Bonner, W. M.,** "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139," *The Journal of biological chemistry*, 1998, 5858-68.
- Rothkamm, Kai und Lobrich, Markus,** "Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 5057-62.
- Rothkamm, Kai, Balroop, Sheena, Shekhdar, Jane, Fernie, Patricia und Goh, Vicky,** "Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure," *Radiology*, 2007, 244-51.
- Schäfer, C. und Klose, K.-J.,** *Übersicht - Verfahren in der Radiologischen Diagnostik* (http://www.k-med.uni-giessen.de/ilias3/Modules/Opsilias/index_opsilias.php?

action=frameset&ref_id=9458&skin=kmed&style=kmed).

Seluanov, Andrei, Mittelman, David, Pereira-Smith, Olivia M., Wilson, John H. und Gorbunova, Vera, "DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 7624-9.

Seymour, C. B. und Mothersill, C., "Relative contribution of bystander and targeted cell killing to the low-dose region of the radiation dose-response curve," *Radiation research*, 2000, 508-11.

Siemens AG, *Computertomographie* (http://elearning.fmi.uni-passau.de/elearning/pages/smarties/CT_Geschichte_Siemens-pdf).

Stephan, G. und Hadnagy, W., *Chromosomal aberrations in patients exposed to X-rays and contrast medium*, 1981.

Stiff, Tom, Reis, Caroline, Alderton, Gemma K. et al., "Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events," *The EMBO journal*, 2005, 199-208.

Stucki, Manuel, Clapperton, Julie A., Mohammad, Duaa et al., "MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks," *Cell*, 2005, 1213-26.

Su, Tin Tin, *Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices*, 2006.

Takahashi, Akihisa und Ohnishi, Takeo, "Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks?" *Cancer letters*, 2005, 171-9.

Theis, Dorothea, *Einführung in die Strahlenphysik*.

Uziel, Tamar, Lerenthal, Yaniv, Moyal, Lilach et al., "Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage," *The EMBO journal*, 2003, 5612-21.

Vorstand des Röntgen-Kuratorium Würzburg e.V., *Über Wilhelm Conrad Röntgen* (<http://www.wilhelmconradoentgen.de/roentgen.htm>).

Vyjayanti, V. N. und Rao, Kalluri Subba, "DNA double strand break repair in brain: reduced NHEJ activity in aging rat neurons," *Neuroscience letters*, 2006, 18-22.

- Ward, Irene M., Minn, Kay, Jorda, Katherine G. und Chen, Junjie,** "Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX," *The Journal of biological chemistry*, 2003, 19579-82.
- Ward, J. F.,** "Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible," *Radiation research*, 1995, 362-8.
- Wild, C. und Puig, S.,** *Nicht-ionische Röntgenkontrastmittel – Klinische Relevanz der Unterschiede verschiedener Kontrastmittel- Vorbereitungspapier für Konsensuskonferenz*, 2003.
- Zhang, Ying, Zhou, Junqing, Cao, Xiaofan et al.,** "Partial deficiency of DNA-PKcs increases ionizing radiation-induced mutagenesis and telomere instability in human cells," *Cancer letters*, 2007, 63-73.

Abkürzungsverzeichnis

ATM	Proteinkinase ataxia teleangiectasia mutated
BRCT-Domäne	BRCA1 carboxyl terminal-Domäne
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CCT	craniale Computertomographie
CT	Computertomographie, Computertomogramm
CTs	Computertomographien
CTDI _{vol}	volumenbezogener CT-Dosisindex
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DLP	Dosislängenprodukt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DSBs	DNA-Doppelstrangbrüche
ESB	DNA-Einzelstrangbruch
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Beschleunigung
Gy	Gray
h	Stunde
hr	hour
hrs	hours
HE	Hounsfield-Einheit

HR	Homologe Rekombination
IR	ionizing radiation, ionisierende Strahlung
KM	Kontrastmittel
kV	Kilovolt
kVp	kilovolt peak
LMDS	locally multiply damaged sites
LNT-Modell	linear no-threshold-Modell
m	männlich
mg	Milligramm
mGy	Milligray
min	Minute(n)/minute(s)
ml	Milliliter
MRN-Komplex	heterotrimerer Proteinkomplex
mSv	Millisievert
NHEJ	Nichthomologes Endjoining
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PCC	premature chromosome condensation, vorzeitige Chromosomenkondensation
s	Sekunde(n)
Sv	Sievert
TUNEL-Methode	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
V	Volt
w	weiblich
w _R	Strahlenwichtungsfaktor

Z	Ordnungszahl
α	alpha
γ	gamma
η	eta
ϕ	phi

Zusammenfassung

Die Computertomographie stellt die Hauptquelle der gegenwärtigen Strahlenexposition der Bevölkerung dar. Nach Bestrahlung sind Doppelstrangbrüche (DSBs) die gravierendsten Läsionen der DNA, da hierbei die genetische Information auf beiden DNA-Strängen unterbrochen wird. Werden Doppelstrangbrüche nicht oder fehlerhaft repariert, kann es zur Entstehung von Mutationen und zur malignen Entartung von Zellen kommen. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen nach Computertomographie in vivo untersucht. Um die Bildgebung zu unterstützen, werden im Rahmen von Computertomographieuntersuchungen häufig Kontrastmittel appliziert. Deren Wirkung auf die Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen in vivo wurde im zweiten Teil dieser Arbeit evaluiert.

Seit einigen Jahren wird γ H2AX als Marker für Doppelstrangbrüche herangezogen. Da allein diese Methode im Bereich von wenigen mGy sensitiv ist, ist sie zur Zeit der Goldstandard für die Detektion von DSBs im Niedrigdosisbereich der Computertomographie. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers werden die Doppelstrangbrüche mittels Immunfluoreszenzmikroskopie in Form von deutlich sichtbaren Foci dargestellt. Dabei entspricht ein Focus genau einem DSB. Der Verlust von γ -H2AX-Foci in Zellkernen entspricht der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.

47 Patienten im Alter von durchschnittlich $56,8 \pm 17,38$ Jahren (Mittelwert \pm Standardabweichung) wurde nach einer klinisch indizierten Computertomographieuntersuchung zu definierten Zeitpunkten Blut abgenommen (vor der Computertomographie als Kontrolle zur Bestimmung des „Hintergrundfocuslevels“, 5 min post CT, 1 h, 2 h sowie 24 h nach der CT-Untersuchung). Die Lymphozyten des Blutes wurden isoliert und mittels der γ -H2AX-Methode die Focusanzahl untersucht.

Im Vergleich zum direkt vor der CT-Untersuchung ermittelten Hintergrundfocuslevel, welches das permanente Schadenslevel der DNA vor Röntgenstrahlenexposition reflektiert, stieg 5 min nach Computertomographie die Focusanzahl um den Faktor 4,2 an. Dies bestätigt, dass Computertomographieuntersuchungen DNA-Schäden in Form von DSBs induzieren und diese mit Hilfe der γ -H2AX-Methode erfolgreich in vivo detektiert

werden können. Die ermittelte Focusanzahl entspricht Ergebnissen anderer Studien. Zu den nachfolgenden Untersuchungszeitpunkten zeigte sich ein linearer Rückgang der Focuswerte, welcher der Reparatur der Doppelstrangbrüche entspricht.

Um den Effekt von Kontrastmittel auf die DSB-Entstehung und -Reparatur zu prüfen, wurden zwei Patientengruppen gebildet. Gruppe I setzte sich aus den 21 Patienten zusammen, die ausschließlich native CT-Untersuchungen erhalten hatten und wies ein mittleres Alter von $59 \pm 18,88$ Jahren (Mittelwert \pm Standardabweichung) auf. Gruppe II bestand aus den 26 Patienten, die während der Computertomographieuntersuchung Kontrastmittel appliziert bekommen hatten und im Mittel $55,04 \pm 15,84$ Jahre alt waren (Mittelwert \pm Standardabweichung). Bei Kontrastmittelapplikation in Gruppe II zeigte sich im Vergleich zur Nativcomputertomographie von Gruppe I 5 min post CT eine um 29% erhöhte Focusanzahl. Dieses Ergebnis sollte Anlass geben, bei der Einschätzung der Strahlenbelastung durch Computertomographie die Kontrastmittelapplikation zu berücksichtigen, da durch sie vermehrt DNA-Schäden entstehen. Vermutlich ist die Ursache ein gesteigerter Photoeffekt, der durch die hohe Ordnungszahl (Z) des im KM enthaltenen Jods verursacht wird. Damit kommt es zu einer vermehrten Bildung von sekundären Radikationen, die die DNA schädigen.

Nach 24 h wiesen beide Gruppen ähnliche residuale Focuswerte auf. Die zusätzlich entstandenen Doppelstrangbrüche bei Kontrastmittelapplikation sind demnach repariert worden.

Hervorzuheben sind die großen interindividuellen Unterschiede der Focuszahlen in unserer Patientenstudie, deren Ursachen in zukünftigen Studien untersucht werden sollten.

Diese Studie ist eine präliminäre Studie. Um definitive Aussagen v.a. zum Kontrastmitteleffekt treffen zu können, bedarf es einer Folgestudie mit einer größeren Patientenzahl. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die Patientengruppen die gleiche Altersstruktur, das gleiche Geschlecht, die gleichen klinischen Vorerkrankungen, die gleiche CT-Untersuchung mit ähnlichen DLP-Werten und die gleiche verabreichte Kontrastmittelmenge aufweisen. Da bisher nicht bekannt ist, inwiefern die genannten Parameter die Ergebnisse beeinflussen, könnte dies Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Summary

Computed tomography is the main source of present radiation exposure of the population. After radiation, double-strand breaks (DSBs) are the most significant lesion of the DNA because the genetic information is compromised on both DNA-strands. If un- or misrepaired, mutations and malignant degeneration of cells may result.

The first part of this work aimed to investigate the induction and repair of double-strand breaks after computed tomography *in vivo*. To enhance medical imaging, contrast media is frequently applied during the CT scans. Their effect on the induction and repair of double-strand breaks *in vivo* is evaluated in the second part of this study.

For several years, γ H2AX has been used as a marker for detecting DSBs. Since this is the only method that has proven to be sensitive in radiation doses as low as a few mGy, it has become the gold standard for the detection of DSBs in computed tomography's low dose range. Using a fluorescent antibody specific for γ H2AX, double-strand breaks can be visualized as foci. Each focus represents precisely one double-strand break. The loss of γ -H2AX foci in the nucleus reflects the repair of the DNA-double-strand breaks.

47 patients with an average age of 56.8 ± 17.38 years (mean \pm standard deviation) underwent a clinically indicated computed tomography. Blood samples were taken at defined points of time (prior as well as 5 min, 1 hr, 2 hrs and 24 hrs after the CT-scan). Lymphocytes were isolated from the blood and the number of foci was quantified by using the γ -H2AX method.

In comparison to the background focus level, which was determined by evaluating the blood sample prior to the CT-scan and which reflects the permanent damage of the DNA before the x-ray exposure, the number of foci 5 min after the CT-scan increased by a factor of 4.2. This confirms that CT examinations induce DNA-damage in the form of double-strand breaks and that these can be successfully detected *in vivo* with the γ -H2AX method. The detected number of foci is consistent with the results of similar studies. The subsequent time points showed a linear decrease of the focus level, reflecting the repair of the induced double-strand breaks.

In order to measure the effect of contrast medium on the formation and repair of double-strand breaks, two patient groups were formed. Group I consisted of 21 patients who solely underwent unenhanced CT and had an average age of 59 ± 18.88 years (mean \pm standard deviation). Group II was comprised of 26 patients who solely received contrast-enhanced CT and had an average age of $55,04 \pm 15,84$ years (mean \pm standard deviation). 5 min post CT, the contrast-enhanced group II showed an increase of 29% in foci levels compared to the unenhanced group I. Since this result suggests that the administration of contrast medium induces additional DNA damage, this should be taken into consideration when estimating the radiation exposure of computed tomography. The greater DNA damage is most likely an effect of an enhanced photoelectric effect due to the high atomic number Z of the iodine in the contrast agent. Thus more secondary radical electrons are generated that damage the DNA.

After 24 hrs both groups showed similar residual foci levels. The additional double-strand breaks due to the contrast medium seem to have been repaired.

The great interindividual differences in the number of foci between the patients have to be emphasized. The cause of the high variance of the DSB numbers and the repair capacity should be explored further.

This study has the character of a preliminary study. In order to draw definite conclusions as to the effect of contrast medium, a follow-up study with a higher number of patients should be initiated. It should take measures to include groups of patients with consistent age structures, sex, pre-existing illnesses, type of CT with similar DLP values and amount of applied contrast medium. And since it is not yet known how the given parameters influence the results, this too could be further investigated.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die nachfolgenden Damen und Herren in Marburg, denen ich an dieser Stelle herzlich danke.

Vorklinischer Studienabschnitt:

Aumüller, Basler, Cetin, Daut, del Rey, Eilers, Feuser, Gemsa, Geus, Grundmann, Hasilik, Kern, Koolman, Lang, Lemansky, Lill, Liss, Löffler, Mandrek, Mueller, Neumüller, Rausch, Röhm, Röper, Seifert, Seitz, Suske, Steininger, Sundermeyer, Weihe, Westermann

Klinischer Studienabschnitt:

Aigner, Al-Fakhri, Alter, Arnold, Bals, Barth, Baum, Bauer, Baumann, Berger, Bien, Boekhoff, Büch, Burchert, Christiansen, Czubayko, Dominguez, Donner-Banzhoff, Engenhardt-Cabillic, Fuchs-Winkelmann, Funck, Geks, Görg, Gress, Grimm, Gudermann, Happle, Hellwig, Herrmann-Lingen, Hertl, Herzum, Höffken, Hofman, Hörle, Hoyer, Jungclas, Kann, Kill, Klenk, Klose, Köhler, Köhler, König, Kolb-Niemann, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Loff, Lohoff, Maier, Maisch, Martin, Mennel, Mittag, Mederos, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Nockher, Oeffner, Oertel, Pagenstecher, Plant, Printz, Renz, Richter, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schäfer, Schmitt, Schofer, Sesterhenn, Sommer, Stief, Strauch, Vogelmeier, Wagner, Werner, Wulf, Yu, Zemlin

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Johannes T. Heverhagen für die hervorragende Unterstützung und die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Jochen Klose danke ich für die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit in der radiologischen Abteilung der Philipps-Universität Marburg.

Ein herzlicher Dank geht an Frau Beate Kleb für die immerwährende Unterstützung und ihr Engagement bei der Verarbeitung der Proben und der Immunfluoreszenzfärbung.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern der Klinik für Radiologie für die Unterstützung bei der Aufklärung der Patienten sowie der Probenakquisition.

Den Mitarbeitern der Klinik für Nuklearmedizin, vor allem Herrn Dr. Martin Béhé, möchte ich für die Möglichkeit der Mitnutzung des Labors und die Unterstützung danken. In besonderer Weise möchte ich mich bei Frau Ursula Cramer bedanken, die mir jederzeit im Labor bei Fragen hilfreich zur Seite gestanden hat.

Schließlich geht der Dank an alle Patienten für die Teilnahme an dieser Studie.