

Aus der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Andreas. H. Mahnken



*Quantifizierung der Steigerung der DNA-  
Doppelstrangbrüche in der Computertomographie durch  
i.v.-Gabe von jodhaltigem Kontrastmittel  
- Einfluss verschiedener Störfaktoren*

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades in der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Alan Peters aus Wiesbaden

Marburg, 2015

Angenommen vom Fachbereich der Medizin der Philipps-Universität Marburg am  
06.10.2015.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. Dr. J. Heverhagen

1. Koreffferent: Frau Prof. Dr.med. R. Engenhardt-Cabillic

## Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>3-5</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Strahlenexposition</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Allgemeines zur Röntgenstrahlung</b>	<b>8</b>
1.2.1 Erzeugung der Röntgenstrahlung	8
1.2.2 Einteilung der Röntgenstrahlung	10
<b>1.3 Computertomographie und Kontrastmittel</b>	<b>10</b>
1.3.1 Historische Entwicklung der Computertomographie	11
1.3.2 Prinzip der Computertomographie	12
1.3.3 Kontrastmittel in der Computertomographie	13
1.3.3.1 Unterteilung der Röntgenkontrastmittel	13
1.3.3.2 Klinisches Nebenwirkungsspektrum der Röntgenkontrastmittel	15
<b>1.4 Effekte der Röntgenstrahlung am Atomkern</b>	<b>15</b>
1.4.1 Photoeffekt	16
1.4.2 Comptoneffekt	16
1.4.3 Paarbildung	16
1.4.4 Klassische Streuung und Kernreaktionen	17
<b>1.5 Formen von DNA-Schäden und DNA-Reparatur</b>	<b>18</b>
1.5.1 Locally Multiply Damaged Sites (LMDS)	18
1.5.2 DNA- Einzelstrangbrüche	19
1.5.3 DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB)	20
1.5.4 DNA-Reparaturmechanismen der Zelle	20
1.5.4.1 Erkennung der DNA-Doppelstrangbrüche	21
1.5.4.2 Nicht-homologes Endjoining (NHE)	22
1.5.4.3 Homologe Rekombination	23
<b>1.6 Quantifizierung der Doppelstrangbrüche</b>	<b>24</b>
1.6.1 Quantifizierung mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie der $\gamma$ H2AX-Foci	25
<b>2. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Zielsetzung</b>	<b>27</b>

Inhaltsverzeichnis	4
<b>2.2 Fragestellung</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Material</b>	<b>30</b>
3.1.1 Geräte	30
3.1.2 Chemikalien	31
3.1.3 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	32
3.1.4 Sonstige Materialien	32
<b>3.2 Patienten</b>	<b>33</b>
3.2.1 Studienprotokoll und Einverständnis	33
3.2.2 Ein- und Ausschlusskriterien	33
3.2.3 Patientenkollektiv	34
<b>3.3 Methoden</b>	<b>35</b>
3.3.1 Computertomographie	35
3.3.2 Blutentnahme	36
3.3.3 Aufbereitung der Lymphozyten	36
3.3.4 Immunfluoreszenzfärbung	37
3.3.5 Fluoreszenzmikroskopie	38
3.3.6 In-vitro Kontrollen	39
<b>3.4 Statistische Auswertung</b>	<b>39</b>
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Allgemeine Betrachtung und Patientengut</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Veränderung der Foci-Zahl durch die CT-Untersuchung</b>	<b>41</b>
4.2.1 Einfluss des Kontrastmittels	42
<b>4.3 Einfluss von Störfaktoren in der Kontrastmittelgruppe</b>	<b>43</b>
4.3.1 Einfluss des Alters	43
4.3.2 Einfluss des BMI	45
4.3.3 Einfluss des Raucherstatus	48
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>50</b>
<b>5.1 Bedeutung der Studie</b>	<b>50</b>
<b>5.2 Diskussion der <math>\gamma</math>H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie als Methode</b>	<b>51</b>
<b>5.3 Diskussion der Studienergebnisse</b>	<b>53</b>
5.3.1 Diskussion des Einflusses von CT und Kontrastmittel auf die Anzahl der DNA-DSBs	53
5.3.2 Diskussion des Einflusses der Störfaktoren auf die Foci-Zahl	56
5.3.2.1 Einfluss des Alters	56

Inhaltsverzeichnis	5
5.3.2.2 Einfluss des BMI	58
5.3.2.3 Einfluss des Raucherstatus	60
<b>5.4 Schwächen und Limitationen der Studie</b>	<b>62</b>
<b>5.5 Ausblick</b>	<b>64</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>68</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>81</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>83</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>85</b>
<b>VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER</b>	<b>87</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>88</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Strahlenexposition

Strahlenexposition durch medizinische Untersuchungen ist ein heutzutage omnipräsentes und wichtiges Thema. Sowohl durch die Medien als auch in privaten Gesprächsrunden werden Mediziner häufig mit dem Begriff "Strahlenexposition" konfrontiert und in eine rechtfertigende Position gedrängt. Es folgt oft eine mühselige Aufklärungsarbeit, in der Vor- und Nachteile abgewogen werden, es um rechtfertigende Indikationen und die immer geringer werdenden Strahlendosen geht. Am Ende der Diskussion überwiegt dann auch meist die Akzeptanz gegenüber den bildgebenden Modalitäten wie CT-, Durchleuchtungs- oder Röntgenuntersuchungen.

Dabei sind wir auch ohne die medizinische Diagnostik umgeben von Strahlenquellen. Es sind etwa 2,1 mSv der jährlichen Strahlenexposition auf die sogenannte natürliche Strahlenexposition zurückzuführen, welche rund 50% der Gesamtstrahlenexposition (4,1 mSv) ausmacht. Sie setzt sich zusammen aus den Zerfallsprodukten des Radon (1,1 mSv), aus kosmischer Strahlung (0,3 mSv), aus terrestrischer Strahlung (0,4 mSv) sowie aus strahlenerzeugender Nahrung (0,3 mSv).

Der Anteil der sogenannten zivilisatorischen Strahlenexposition beläuft sich auf etwa 1,9 mSv pro Jahr, hier stellt dann in der Tat die medizinische Diagnostik den Großteil (1,8 mSv) dar, der Rest verteilt sich auf freigesetzte Kernenergie, Technik, Forschung und Haushalt. Unterm Strich macht sie also die restlichen 50% der jährlichen Gesamtstrahlenexposition aus.

Hervorzuheben ist bei der zivilisatorischen Strahlenexposition allerdings die Dynamik der Entwicklung:

Von 1996 bis 2011 ist die jährliche Strahlenexposition durch medizinische Diagnostik um 13% angestiegen, wobei dieser Anstieg im Wesentlichen durch die CT-Untersuchungen getragen wird (siehe Abbildung 2). Untermauert wird dieser Wert

durch die Zunahme der CT-Untersuchungen im selben Zeitraum (ca. 130%). Allerdings gilt diese Entwicklung auch für andere bildgebende Modalitäten, die ohne Röntgenstrahlung auskommen, wie zum Beispiel das MRT. Hier haben sich die Untersuchungszahlen im Zeitraum von 1996-2011 sogar verfünffacht (sämtliche Zahlen aus dem Bundesamt für Strahlenschutz, Parlamentsbericht 2012).

Zur gleichen Zeit allerdings haben sich durch Weiterentwicklung der Technik die verwendeten Energiedosen erheblich reduziert. So berichteten Pathe et al. 2011 bei CT-Thorax-Untersuchungen noch von durchschnittlich 10 mSv, während sich dieser Wert heute im Schnitt auf 4,7- 5,2 mSv pro Untersuchung halbiert hat (Bundesamt für Strahlenschutz).

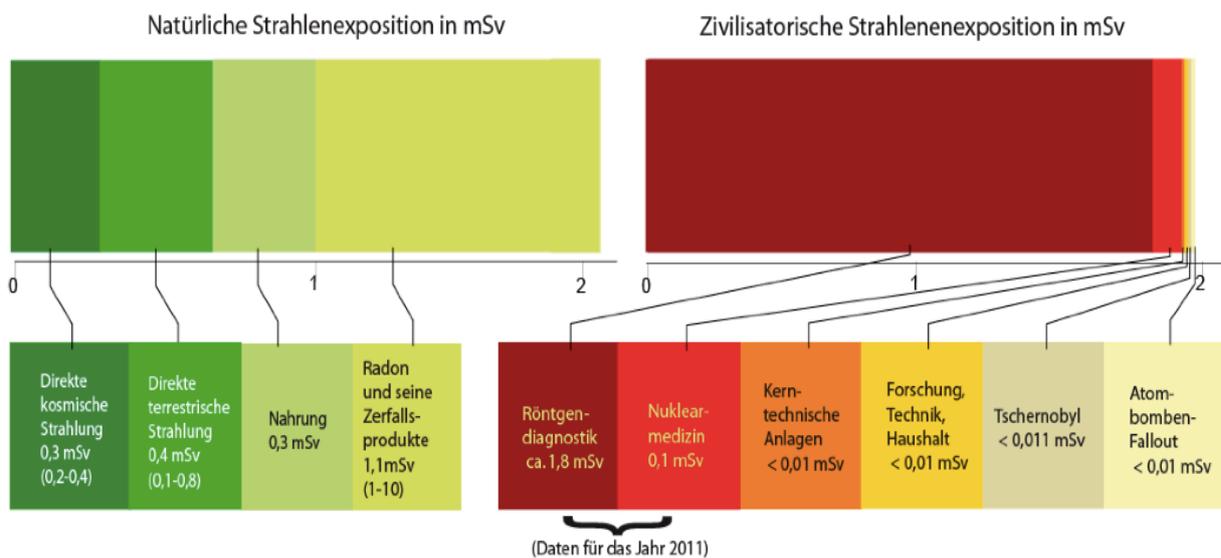


Abbildung 1: Effektive Jahresdosis einer Person durch ionisierende Strahlung in mSv im Jahr 2012, gemittelt über die Bevölkerung Deutschlands und aufgeschlüsselt nach Strahlenursprung (Quelle: Bundesamt für Strahlenschutz, Parlamentsbericht 2012)

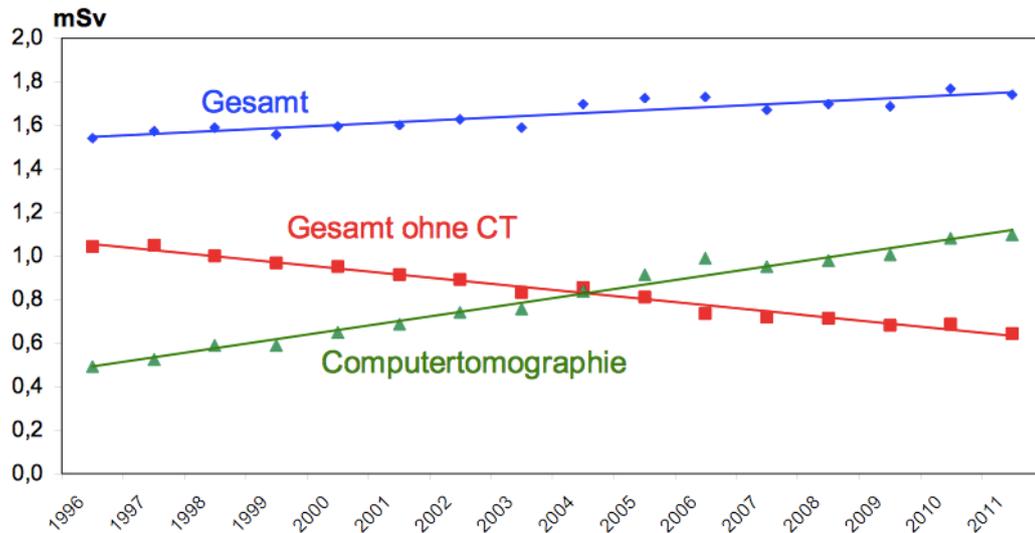


Abbildung 2: Mittlere effektive Dosis durch Röntgenuntersuchungen mit und ohne CT sowie Dosis durch CT pro Einwohner und Jahr (Quelle: Bundesamt für Strahlenschutz, Parlamentsbericht 2012)

## 1.2 Allgemeines zur Röntgenstrahlung

Für CT- und Röntgenuntersuchungen muss mittels komplexer Prozesse die Röntgenstrahlung zunächst erzeugt, danach kontrolliert abgegeben und schließlich wieder detektiert werden, um auswertbares Bildmaterial zu erhalten. Zudem spielen strahlenschützende Maßnahmen sowohl für Behandler als auch für Patienten heutzutage eine große Rolle.

### 1.2.1 Erzeugung der Röntgenstrahlung

Wilhelm Conrad Röntgen war 1895 derjenige, der den Röntgenstrahlen für diagnostische Zwecke ihre Bedeutung gab und formal als ihr Entdecker gilt, wobei dieses Faktum in der Fachwelt durchaus diskutiert wird (Deckers und van Tiggelen 2001).

Wie auch immer, Röntgen erkannte die Bedeutung der neuen Strahlenart sehr früh und wurde für seine Entdeckung 1901 entsprechend mit dem Nobelpreis für Physik ausgezeichnet (Röntgen 1896).

Strahlung im Allgemeinen ist zu verstehen als ein Energietransport, ohne dass hierfür ein bestimmtes Medium benötigt wird. Sie lässt sich adäquat sowohl mit dem Teilchen- als auch mit dem Wellenmodell erklären, man spricht daher in der Quantenphysik auch vom sogenannten Welle-Teilchen-Dualismus.

Bei der Röntgenstrahlung handelt es sich bei entsprechenden Teilchen um Photonen, die mithilfe eines Röntgenstrahlers erzeugt werden. Dieser besteht aus einer Röntgenröhre und einer Schutzummantelung. Die Röntgenröhre wiederum besteht aus einer Kathode und einer Anode.

Durch eine Heizung wird der Wolframdraht der Kathode zum Glühen gebracht und setzt bei hohen Temperaturen (ca. 2000 °C) Elektronen frei. Diese werden im elektrischen Hochspannungsfeld zwischen Kathode und Anode beschleunigt, beim Auftreffen auf die Anode werden 99% der kinetischen Energie in thermische Energie und 1% in elektromagnetische Strahlung umgewandelt. Deswegen bedarf die Anode einer ständigen Kühlung (Kiefer und Kiefer 2003).

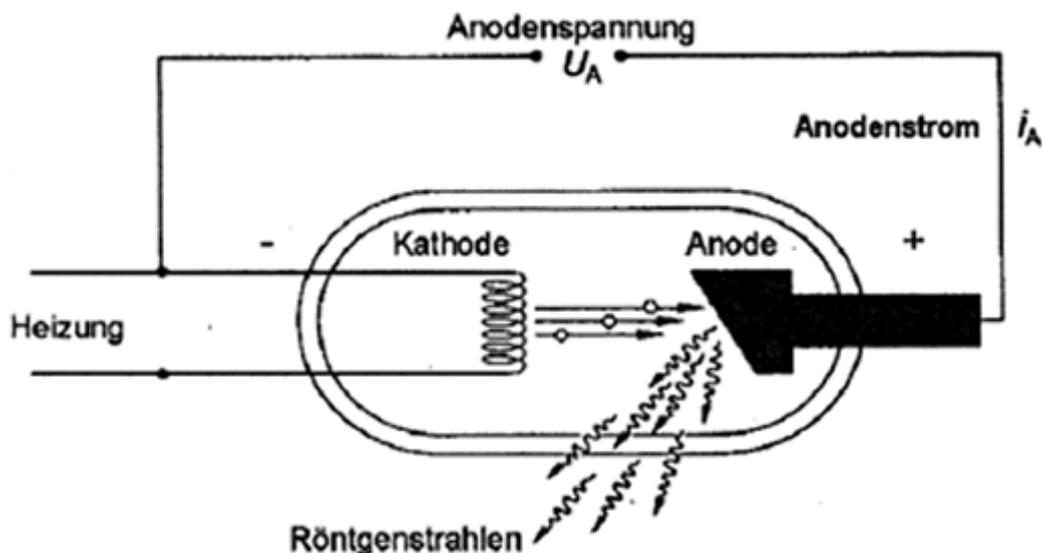


Abbildung 3: Prinzip einer Röntgenröhre (Quelle: Radiologische Abteilung der Universität Marburg; [http://online-media.uni-marburg.de/radiologie/lehre/bilder/roe\\_roehre.gif](http://online-media.uni-marburg.de/radiologie/lehre/bilder/roe_roehre.gif))

### **1.2.2 Einteilung der Röntgenstrahlung**

Bei der auf die beschriebene Weise entstehende elektromagnetischen Strahlung handelt es sich um die sogenannte Bremsstrahlung, es entsteht ein kontinuierliches Bremsspektrum beim Auftreffen der Elektronen auf das Anodenmaterial.

Die zweite Art elektromagnetischer Strahlen ist die charakteristische Strahlung, die durch Wechselwirkung der Elektronen mit dem Anodenmaterial entsteht und hochspezifisch für das jeweilige Anodenmaterial ist. Dabei werden die Hüllelektronen der Anodenatomkerne kurzzeitig energetisch angeregt, verlassen ihre Schale zugunsten einer energetisch höheren Schale und fallen später wieder in ihren Grundzustand zurück. Hierbei wird die Differenzenergie als charakteristische Strahlung frei (Kiefer und Kiefer 2003).

Des Weiteren kann die Röntgenstrahlung entsprechend ihrer Energie in drei unterschiedliche Qualitäten unterteilt werden:

1. Weiche Strahlung ( $< 100$  keV) eignet sich zur Darstellung annähernd gleicher Strukturen mit schwachem Kontrast, wie zum Beispiel in der Mammadiagnostik.
2. Harte Strahlung (100 keV bis 1 MeV) hingegen macht Dichteunterschiede verschiedener Gewebe besser sichtbar.
3. Ultraharte Strahlung ( $> 1$  MeV) wird in der Strahlentherapie eingesetzt.

### **1.3 Computertomographie und Kontrastmittel**

Da in unserer Studie Computertomographien des Thorax mit und ohne Kontrastmittel durchgeführt wurden, sollen im Folgenden einige theoretische Grundlagen zu den Themen Computertomographie und Kontrastmittel dargestellt werden.

### **1.3.1 Historische Entwicklung der Computertomographie**

Die ersten Schritte der Entwicklung der Computertomographie gehen bis ins Jahr 1917 zurück als Johann Radon die nach ihm benannte Radon-Transformation entwickelte, mit deren Hilfe man räumliche Aufnahmen von Objekten und deren Innenstrukturen berechnen konnte (Radon 1917). Allerdings erkannte Radon die Bedeutung und Tragweite seiner Entdeckung noch nicht vollständig. Es dauerte bis ins Jahr 1963 als der Physiker Allen McLeod Cormack unabhängig von Radons Erkenntnissen ein ähnliches theoretisches Modell entwickelte und dieses prüfte, indem er die Röntgenröhre um Objekte rotieren ließ. Der erste Computertomograph wurde dann schließlich 1971 von Cormack gemeinsam mit dem Elektrotechniker Godfrey N. Hounsfield entwickelt. Die erste CT-Untersuchung überhaupt war eine Schädeluntersuchung, die im Atkinson-Morley's Hospital in England durchgeführt wurde. Cormack und Hounsfield wurden für ihre Leistungen im Jahr 1979 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Seitdem hat sich die Computertomographie rasant entwickelt, durch die Entwicklung des Spiral-CTs sind heutzutage die 3D-Bildgebung oder CT-Angiographien möglich und im klinischen Alltag keine Besonderheiten mehr. Eine weitere bedeutende Neuerung war Ende der 90er Jahre die Entwicklung der Mehrschicht-Computertomographie, mit der mehrere Körperschichten gleichzeitig erfasst werden können und somit eine bessere Auflösung und Bewegungsschärfe, aber auch kürzere Untersuchungszeiten gewährleistet werden (Prokop 2003). Durch solche technischen Fortschritte wird das CT in der Medizin sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie immer wertvoller. Dies unterstreicht auch die Zunahme der CT-Untersuchungen über die letzten 20 Jahre. Das Bundesamt für Strahlenschutz verzeichnete zwischen 1996 und 2011 eine Zunahme um 130%.

### 1.3.2 Prinzip der Computertomographie

Die Computertomographie gehört zusammen mit der Magnetresonanztomographie und der Ultraschalluntersuchung zu den sogenannten Schnittbildverfahren. Im Gegensatz zur klassischen Röntgenuntersuchung rotiert die Röntgenröhre mit dem dazugehörigen Detektor um das zu untersuchende Objekt, die Einheit aus Röhre und Detektor bezeichnet man auch als Gantry. Dabei wird das Objekt schichtweise umfahren und kann anschließend überlagerungsfrei in diesen Schichten dargestellt werden. Die modernen Multidetektor-Computertomographen verfügen über mehrere Detektorzeilen hintereinander, sodass zum Beispiel ein 64-Zeiler gleichzeitig 64 Schichtebenen mit nur einer Umrundung erfassen kann. Die einzelnen Bildpunkte bezeichnet man als Pixel, beim CT bezeichnet man die kleinste Einheit allerdings als Voxel, welches durch Multiplikation eines Pixels mit der Schichtdicke entsteht. Die Abschwächung der Röntgenstrahlung an einem jedem Voxel wird mittels der Radon-Transformation in Bildinformation umgerechnet und kann nach mehreren Umrechnungsschritten anschließend in Graustufen kodiert dargestellt werden. Diese Graustufen entsprechen einzelnen CT-Werten und werden auch als Hounsfield-Einheiten (HE) bezeichnet. Sie werden immer in Relation zu Wasser angegeben, welches eine HE= 0 hat. Dichtere Gewebe haben entsprechend höhere HE-Werte, weniger dichte Gewebe haben HE-Werte kleiner 0. Bei der Beurteilung werden je nach Gewebedichte immer die entsprechenden Gewebefenster gewählt, da das menschliche Auge unmöglich sämtliche Graustufen jeden Gewebes unterscheiden kann. Bei dieser sogenannten Fenstertechnik wird das zu untersuchende Gewebe gut differenziert dargestellt, während Gewebe anderer Dichte einfach schwarz oder weiß erscheinen (Prokop et al. 2003; Schäfer und Klose 2008).

Immer häufiger angewandt wird heutzutage die Umrechnung der 2-dimensionalen Bilder in 3-dimensionale Bilder, welche qualitativ immer besser und für einige Fragestellungen bereits bevorzugt angewendet werden (Tartaglione 2012, Calisir 2012, Pekcevic 2013).

### **1.3.3 Kontrastmittel in der Computertomographie**

Von großer Bedeutung ist auch der Einsatz von Röntgenkontrastmitteln in der Computertomographie. Sie erleichtern das Erkennen unterschiedlicher Gewebearten, indem sie die Dichteunterschiede zwischen dem betreffenden Organ und dem umliegenden Gewebe erhöhen. Dies geschieht durch vermehrte Strahlenabsorption im Kontrastmittel-angereicherten Gewebe. Je mehr Kontrastmittel ein Gewebe enthält, desto heller wird es computertomographisch dargestellt (Clement 2002). Einige pathologische Prozesse werden erst nach Kontrastmittelgabe sichtbar oder weisen eine spezielle Kontrastmittelkinetik auf, die dann zur richtigen Diagnose führt (Yang 2013, Lewis 2013)

Kontrastmittel kommen selbstverständlich ebenso in der MR- oder der Ultraschalldiagnostik zur Anwendung, auf diese soll in dieser Arbeit aber nicht näher eingegangen werden.

#### **1.3.3.1 Unterteilung der Röntgenkontrastmittel**

Allgemein lassen sich die Röntgenkontrastmittel in röntgenpositive und röntgennegative Kontrastmittel einteilen. Röntgenpositive Kontrastmittel weisen typischerweise eine hohe Ordnungszahl auf, zum Beispiel haben Bariumsulfat oder Jodverbindungen Ordnungszahlen größer 50.

CO<sub>2</sub> oder Luft hingegen sind röntgennegative Kontrastmittel, werden gering bis gar nicht vom Gewebe absorbiert und haben entsprechend niedrigere Ordnungszahlen. Sie werden häufig in Verbindung mit Bariumsulfat in der sogenannten Doppelkontrasttechnik eingesetzt, um entzündliche oder tumoröse Veränderungen zum Beispiel der Darmschleimhaut erkennen zu können. Heutzutage steht für die Kolonuntersuchung außerdem auch die virtuelle Koloskopie zur Verfügung, die durch ausgereifere technische Möglichkeiten zunehmend an Bedeutung gewinnt (von Wagner 2011, Neri 2013). CO<sub>2</sub> wird zudem häufig bei Angiographien eingesetzt.

Die röntgenpositiven KM lassen sich weiter in Subgruppen unterteilen. So gehört Bariumsulfat zu den unlöslichen KM, während Iodverbindungen sich in fett- oder wasserlösliche Verbindungen weiterunterteilen lassen. Fettlösliche Verbindungen werden bevorzugt für Lymphographien eingesetzt. Die wasserlöslichen Iodverbindungen teilt man schließlich in ionische und nicht-ionische Verbindungen ein, wobei die ionischen Verbindungen hyperosmolar gegenüber Blut sind und somit bei intravasaler Anwendung schlechter vertragen werden als nicht-ionische Verbindungen (Namasivayam 2006). Die wasserlöslichen nicht-ionischen Kontrastmittel sind intravasal, oral oder auch rektal anwendbar und können somit vielseitig eingesetzt werden, so zum Beispiel für Urographien, Darstellungen des Magendarmtrakts, Angiographien und für viele weitere Organe (Schäfer und Klose 2008, Hünenbein 2011).

Der Einsatz von Röntgenkontrastmitteln in der Diagnostik steigt weiter stetig an (Rotter et al. 2003), bereits im Jahr 2003 wurden weltweit 80 Millionen Injektionen Kontrastmittel appliziert und dabei insgesamt etwa 8 Millionen Liter Kontrastmittel eingesetzt (Persson et al. 2005).

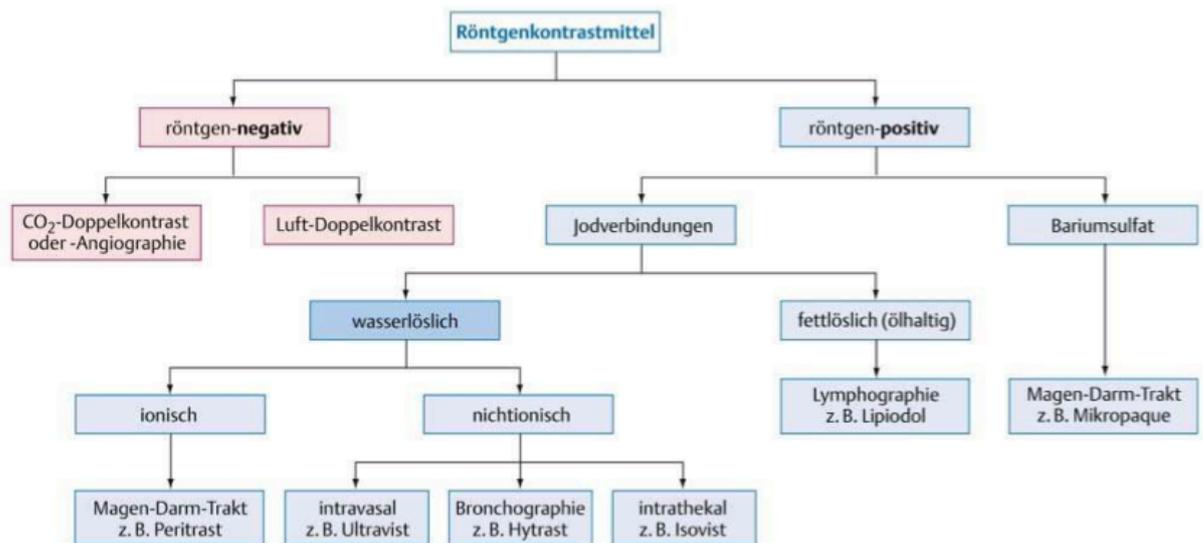


Abbildung 4: Übersicht und Einteilung der Röntgenkontrastmittel (Quelle: Reiser, Kuhn, Debus "Duale Reihe Radiologie" S. 90)

### **1.3.3.2 Klinisches Nebenwirkungsspektrum der Röntgenkontrastmittel**

Trotz der weiten Verbreitung der Röntgenkontrastmittel und der Tatsache, dass sie medizinisch als sicher eingestuft werden, sind die möglichen Nebenwirkungen nicht zu unterschätzen. Diese weisen ein sehr breites und variables Spektrum auf, unter anderem abhängig von der Art der angewendeten Substanz. Die ionisierten Kontrastmittel zum Beispiel sind aufgrund ihrer hohen Osmolarität belastend für das Herz-Kreislauf-System (Katayama et al. 1990).

Das Spektrum der Nebenwirkungen umfasst leichte Symptome wie Hitze- oder Kältegefühl, Grippe-ähnliche Symptome oder Flush, aber auch schwere Symptome wie Schilddrüsenfunktionsstörungen, Übelkeit und Erbrechen, kardialer Arrest, schwere anaphylaktische Reaktionen oder die nephrogene systemische Sklerose.

Die Nebenwirkungen lassen sich einteilen in Früh- und Spätreaktionen (< 1h bzw. > 1h), weiterhin lassen sich Reaktionen mit von Reaktionen ohne Hypersensitivitätskomponente differenzieren (Böhm et al. 2012).

Allerdings steht die Nephrotoxizität, welche die bedeutendste Nebenwirkung der iodhaltigen Kontrastmittel darstellt (Becker et al. 2007), aktuell zur Diskussion (Katzberg et al. 2010).

Das in unserer Studie verwendete Iopromid (Ultravist®) wies in einer Studie von 2008 eine Nebenwirkungsrate von 1,5% auf (Kopp et al. 2008).

## **1.4 Effekte der Röntgenstrahlung am Atomkern**

Die Effekte von elektromagnetischer Strahlung an Materie sind abhängig von der verwendeten Energiedosis. Man beobachtet dann entsprechend der Dosis verschiedene Phänomene, die im Folgenden näher beleuchtet werden.

### **1.4.1 Photoeffekt**

Ist die Energiedosis etwa gleich der Elektronenbindungsenergie der Hüllelektronen kommt es zum sogenannten Photoeffekt. Dabei absorbiert ein Hüllelektron die gesamte Energie des einfallenden Photons und wird als Photoelektron aus der Schale herausgeschleudert. Anschließend wird die Schale mit einem Elektron einer höheren Energiestufe wieder aufgefüllt und die Differenzenergie wird als charakteristische Strahlung oder seltener auch als Auger-Elektron frei. Der Photoeffekt tritt hauptsächlich bei Energien von etwa 50 keV auf. (Kiefer und Kiefer 2003, Schäfer und Klose 2008, Hall und Giaccia 2006)

### **1.4.2 Comptoneffekt**

Ist die Energiedosis höher als die Bindungsenergie des Hüllelektrons kommt es zum sogenannten Comptoneffekt. Hierbei gibt der Energiequant nur einen Teil seiner kinetischen Energie an das Hüllelektron ab, schleudert es aus seiner Bindung und fliegt selbst mit geringerer Energie in abgelenkter Flugbahn weiter. Dieser Effekt tritt vorwiegend bei Energien von 100 keV - 1,0 MeV auf. (Kiefer und Kiefer 2003, Schäfer und Klose 2008, Hall und Giaccia 2006)

### **1.4.3 Paarbildung**

Hat die Strahlung eine Energie von mindestens 1,02 MeV kann die sogenannte Paarbildung auftreten, da bei dieser Energie die Ruheenergie der beteiligten Teilchen überschritten wird. Das Photon wird vom Atomkern absorbiert und wandelt sich in ein Elektron-Positron-Paar um. Das Positron vereinigt sich daraufhin mit einem in der Nähe liegenden Elektron und es kommt zur sogenannten Vernichtungsstrahlung. Das bedeutet, es entstehen wiederum zwei Photonen, die in einem Winkel von  $180^\circ$  auseinanderfliegen. Dieser Effekt wird bei der Positronen-

Emissions-Tomographie zur Erzeugung von Bildmaterial genutzt. (Kiefer und Kiefer 2003, Schäfer und Klose 2008, Hall und Giaccia 2006)

#### 1.4.4 Klassische Streuung und Kernreaktionen

Bei der klassischen oder kohärenten Streuung, trifft ein Photon auf ein Hüllelektron und verändert dabei seine Flugrichtung ohne Energie abzugeben (Zöllner 2010).

Bei extrem hohen Strahlungsenergien ( $> 2\text{MeV}$ ) können verschiedene Kernreaktionen auftreten, bei denen es unter anderem zur Emission von Protonen oder Neutronen kommen kann. Diese spielen in der Strahlendiagnostik aber nur eine untergeordnete Rolle.

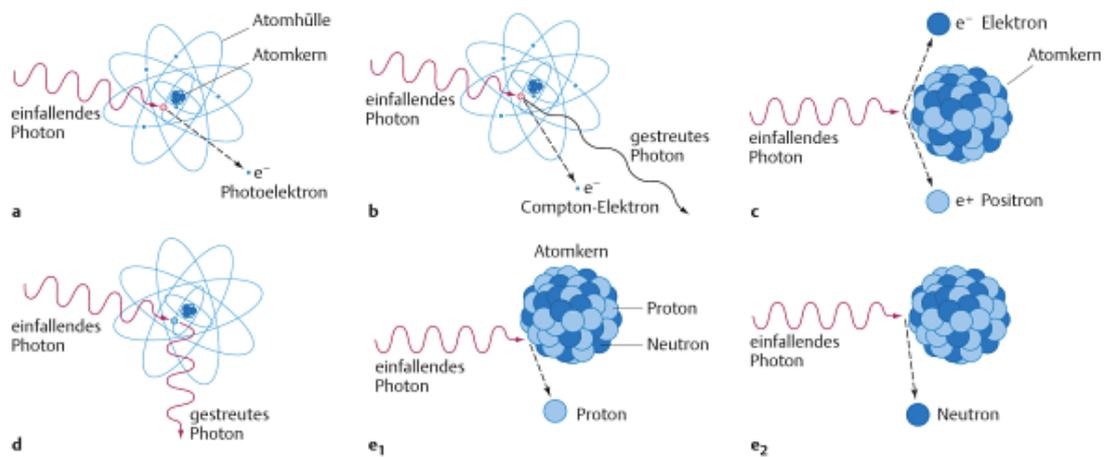


Abbildung 5: Wechselwirkung von Strahlung mit Materie (Quelle: Duale Reihe Radiologie; Kuhn/Debus/Reiser; Stuttgart: Thieme, 3. Aufl., 2011, S.12)

a: Photoeffekt

b: Comptoneffekt

c: Paarbildung

d: kohärente Streuung

e1: Kernreaktion mit Emission eines Protons

e2: Kernreaktion mit Emission eines Neutrons

## 1.5 Formen von DNA-Schäden und DNA-Reparatur

Schon sehr früh wurde erkannt, dass Strahlenschäden maßgeblich getragen werden von der Schädigung der DNA und nicht von Schäden des Zytoplasmas (Munro 1970). Zu unterscheiden sind die direkte und die indirekte Wirkung der Strahlung an der DNA. Die direkte Strahlenschädigung tritt vorwiegend bei dicht ionisierender Strahlung auf, wie zum Beispiel der  $\alpha$ -Strahlung, welche aus Heliumkernen besteht. Das Teilchen tritt in diesem Fall direkt mit der DNA in Wechselwirkung und hinterlässt angeregte und ionisierte Atome. Strahlung bestehend aus Elektronen interagiert auf dieselbe Weise mit der DNA.

Für die elektromagnetische Strahlung sind die sogenannten indirekten Wechselwirkungen mit der DNA bedeutsamer. Hierbei werden durch die Ionisationsprozesse Radikale und ionisierte Moleküle gebildet, meist aus dem im Körper ubiquitär vorkommenden Molekül  $\text{H}_2\text{O}$ , welche dann mit der DNA in Wechselwirkung treten (Grudzinski et al. 2009). Überwiegend werden zunächst ionisierte Wassermoleküle gebildet, welche dann anschließend kurzlebige Hydroxyl-Radikale und Hydronium-Ionen erzeugen. Das Hydroxylradikal gilt dabei als Verursacher von Zweidrittel der DNA-Schäden (Ward J. 1985; Chatgililoglu und O'Neill 2001).



Abbildung 6: Entstehung von ionisierten Molekülen und Radikalen des Wassers (Quelle: Grudzinski et al. 2009)

### 1.5.1 Locally Multiply Damaged Sites (LMDS)

Die Strahlungsenergie erzeugt die Radikale entlang der DNA nicht gleichmäßig sondern in lokalen Anhäufungen, diese bezeichnet man als Spurs und Blobs. Spurs bestehen aus 3 Ionenpaaren, sind ca. 4 nm groß und entsprechen ungefähr einer deponierten Energie von 100 eV.

Die selteneren Blobs hingegen bestehen aus 12 Ionenpaaren, sind 7 nm groß und entsprechen ungefähr einer deponierten Energie von 100-500 eV.

Treten nun diese lokalen Anhäufungen innerhalb eines gewissen Radius um die DNA herum auf, erzeugen sie Mehrfachschäden an der DNA, die sogenannten Locally Multiply Damaged Sites (LMDS). Diese finden sich innerhalb weniger Basenpaare und werden durch eine einzige Bahnspur erzeugt (Ward J. 1990, Grudzenski 2009).

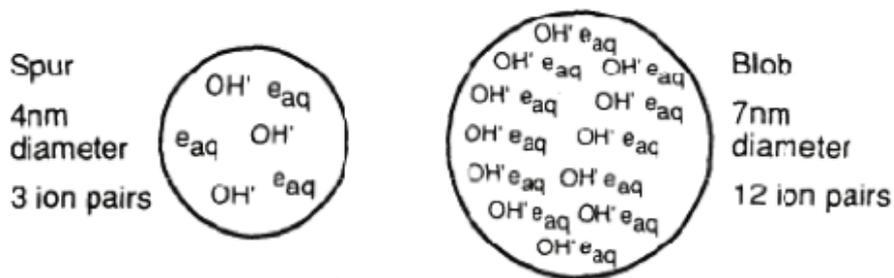


Abbildung 7: Spurs und Blobs in schematischer Darstellung (Quelle: Grudzenski et al. 2009)

### 1.5.2 DNA- Einzelstrangbrüche

Die DNA Einzelstrangbrüche lassen sich in 4 Klassen unterteilen (Obe et al. 1992):

Klasse I: Strangbruch durch Schnitt in der Phosphodiesterbindung ohne Modifikation von Zucker oder Base

Klasse II: Strangbruch durch Fehlen einer Phosphatgruppe ohne Modifikation von Zuckern oder Basen

Klasse III: Strangbruch durch Modifikation von Zucker oder Basen mit oder ohne Fehlen der Phosphatgruppe

Klasse IV: Strangbruch durch Verlust eines Nukleotids.

Die DNA-Einzelstrangbrüche sind für die Zelle einfach zu reparieren und stellen deshalb keine wesentliche Gefahr für die Integrität des Genmaterials dar (Ward J. 1995; Grudzenski 2009).

### **1.5.3 DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB)**

Die DNA-Doppelstrangbrüche sind zwar wesentlich seltener als die Einzelstrangbrüche, allerdings sind sie die viel bedeutenderen und schwerwiegenderen Schäden an der DNA und können auch an der Entstehung von Mutationen und somit an der Karzinogenese beteiligt sein (Ward J. 1995, Zhang et al. 2007). Wird ein wichtiges Genprodukt durch den Doppelstrangbruch geschädigt, kann bereits ein einzelner Doppelstrangbruch zum Tod der Zelle führen (Jackson 2002).

Definitionsgemäß muss das Zucker-Phosphat-Gerüst beider Stränge in einem Abstand von maximal 10 Basenpaaren unterbrochen sein, um von einem DNA-Doppelstrangbruch sprechen zu können. Da die beiden Einzelstrangbrüche sich meistens nicht direkt gegenüber liegen, entstehen Enden mit sogenannten einzelsträngigen Überhängen. Oftmals fehlt am entsprechenden Ende die 3'-OH-Gruppe. Man spricht in diesem Zusammenhang dann auch von komplexen Brüchen (Grudzenski 2009).

### **1.5.4 DNA-Reparaturmechanismen der Zelle**

Die DNA wird in unserem Alltag durch verschiedene Noxen auf vielfältigste Art und Weise geschädigt, weswegen es für unser Überleben von essentieller Bedeutung ist, über entsprechende Reparaturmechanismen in unseren Zellen zu verfügen. DNA-Einzelstrangbrüche können dank des erhaltenen Gegenstrangs, der dann bei der Resynthese als Matrize dient, relativ leicht repariert werden (Ismail 2007).

Die bedeutendsten Schäden hinsichtlich des Zellüberlebens und Mutagenität stellen die DNA-Doppelstrangbrüche dar (Ward J. 1995, Zhang 2007), sodass hier näher auf die speziellen Reparaturmechanismen dieser Schäden eingegangen werden soll.

Es gibt im Allgemeinen zwei wesentliche Reparaturmechanismen der Doppelstrangbrüche: Das Nicht-homologe Endjoining und die Homologe Rekombination (Pardo et al. 2009). Das Nicht-homologe Endjoining wird dabei von der Zelle bevorzugt eingesetzt (Kakaroukas et al. 2014).

Zunächst einmal aber muss die Zelle den DNA-Doppelstrangbruch mittels komplexer Vorgänge überhaupt erkennen können.

#### **1.5.4.1 Erkennung der DNA-Doppelstrangbrüche**

Tritt ein DSB der DNA auf, kommt es zu strukturellen Veränderungen des Chromatins (Bakkenist und Kastan 2003). Diese Veränderung kann durch sogenannte Sensorproteine erkannt werden, ein Vertreter davon ist das ATM (ataxia teleangiectasia mutated). Es wird durch Autophosphorylierung von einem dimeren Zustand in einen monomeren Zustand überführt und ist so in der Lage das in den Doppelstrangbrüchen exponierte Histon H2AX zu phosphorylieren. Dieses wird dadurch innerhalb weniger Sekunden nach Strahlenexposition zum sogenannten  $\gamma$ H2AX (Rogakou et al. 1999). Interessanterweise entstehen die  $\gamma$ H2AX dabei nicht nur an der lokalen Stelle des Schadens, sondern auch im weiter umgebenden Bereich (Pilch et al. 2003). Es sind aber noch weitere Mediatoren nötig, um Doppelstrangbrüche erkennen zu können. So wird für die Akkumulation der ATM am entsprechenden Ort der sogenannte MRN-Komplex benötigt, der sich wiederum aus den Untereinheiten MRE11, RAD50 und Nbs1 zusammensetzt (Uziel et al. 2003, Stiff et al. 2005). Zur Verstärkung der Schadensantwort führen dann noch weitere Mediatoren, wie MDC1, 53BP1 und BRCA1. Diese binden an die Schadensmediatoren und fördern deren Interaktion untereinander (Su 2006).

Die entscheidende Komponente für die Erkennung der  $\gamma$ H2AX ist allerdings die

Bindung von MDC1 an das Nbs1 des MRN-Komplexes (Stucki et al. 2005), da das MDC1 direkt die  $\gamma$ H2AX-Histone bindet. Anschließend vermittelt das MDC1 die Bindung von 53BP1 an den Bruch (Ward I. et al. 2003, Bekker-Jensen 2006). Auf diese Art und Weise können weitere ATM-Moleküle rekrutiert werden, was dann zu einer Art positiven Rückkopplung und zur bereits beschriebenen Ausbreitung des  $\gamma$ H2AX-Signals über eine Strecke von mehreren Mega-Basenpaaren führt (Grudzenski 2009).

#### **1.5.4.2 Nicht-homologes Endjoining (NHE)**

Das Nicht-homologe Endjoining wird von der Zelle bevorzugt angewendet um Doppelstrangbrüche zu reparieren (Kakaroukas 2014) und ist somit der wichtigste und auch der schnellste Weg, um diese Art von Schäden zu beheben. Es kann während der gesamten Interphase stattfinden. Beim NHE werden die DNA- Enden eher an ihrer Struktur als an ihren Sequenzen erkannt, was fehlerbehaftet ist (Pfeiffer et al. 2004). Der erste Schritt ist die Bindung einer Heterodimers aus Ku70/Ku80-Proteinen an die Bruchstelle (Walker et al. 2001). Dieses rekrutiert in der Folge die katalytisch wirksame Untereinheit der DNA-Proteinkinase, die sogenannte DNA-PK<sub>CS</sub> und gemeinsam bilden sie das Holoenzym DNA-Proteinkinase (Smith und Jackson 1999). Dieses Enzym aktiviert durch Phosphorylierung wiederum weitere Enzyme wie LigIV und dessen Koenzym XRCC4 (Burma et al. 2006). Diese bilden dann einen engen Komplex und stimulieren somit die DNA-Ligation (Calsou et al. 2003). Nun verbinden sich die beiden Kernkomponenten, der LigIV/XRCC4-Komplex und die DNA-PK, zu einem neuen Komplex, welcher für die Bruchversiegelung verantwortlich ist (Drouet et al. 2005). Dieser Komplex funktioniert nur bei nicht modifizierten, glatten DNA-Enden einwandfrei (van Heemst et al. 2004). Liegen Veränderungen der Enden vor, wie zum Beispiel 3'Phosphat- oder Phosphoglykolat-Reste, werden zusätzliche Nukleasen oder DNA-Polymerasen notwendig (Grudzenski 2009). Durch diese kann es allerdings zum Verlust von Basen und zu Veränderungen der genetischen Information und somit auch zu Mutationen kommen (Helleday et al. 2007).

Zusätzlich zu diesen beiden Komponenten wird im Frühstadium des Schadens wohl auch der Cernunos/ XLF-Komplex aktiviert, welcher ähnlich dem LigIV/XRCC4-Komplex aufgebaut ist und unter anderem ebenfalls LigIV aktiviert (Yano et al. 2009). Die Aktivierung des Proteins Artemis wird in Verbindung mit der DNA-Proteinkinase gebracht. Es wirkt am ehesten als Endonuklease und prozessiert modifizierte Basen an einzelsträngigen Enden (Riballo et al. 2004).

Eine weitere Art des Endjoinings, das sogenannte alternative Endjoining (A-EJ), ist Gegenstand aktueller Forschung (Frit et al. 2014). Da seine Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen allerdings noch nicht vollständig verstanden ist, soll an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden.

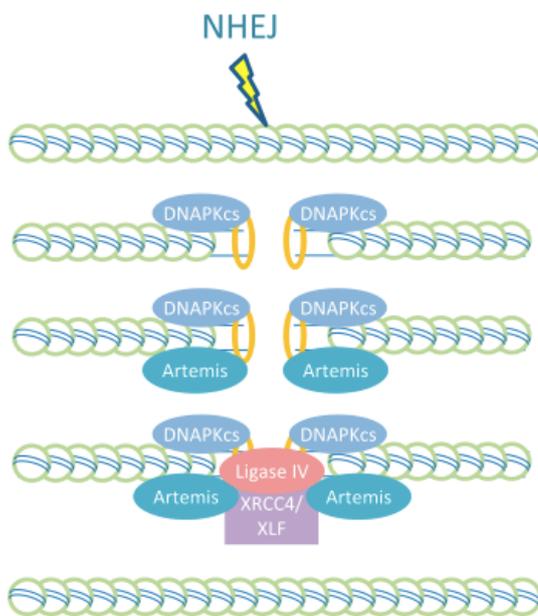


Abbildung 8: Nicht-homologes Endjoining schematisch (Quelle: Kakaroukas 2014)

### 1.5.4.3 Homologe Rekombination

Die homologe Rekombination ist weniger fehlerbehaftet als das Nicht-homologe Endjoining. Mithilfe der homologen Sequenzen der Schwesternchromatiden oder der homologen Chromosomen gelingt die Resynthese der DNA-Sequenz. Dafür wird

zunächst der MRN-Komplex aktiviert, welcher den Doppelstrangbruch erkennt und prozessiert. Durch ATM werden Mre11 und Nbs1 aus diesem Komplex phosphoryliert, Mre11 ist anschließend gemeinsam mit anderen Enzymen an der Resektion des Stranges beteiligt. Es entstehen einzelsträngige Abschnitte, welche mit RPA (human single strand binding protein) besetzt und somit stabilisiert werden. Im nächsten Schritt wird RPA dann durch Rad51 ersetzt. Dieses windet sich um die DNA und katalysiert die Homologiesuche. Die Stranginversion in den komplementären Gegenstrang, der als Matrize dient, wird durch die Rad52-Epistasis-Gruppe katalysiert (West 2003). Die DNA-Polymerase  $\eta$  verlängert den Strang (McIlwraith et al. 2005), bevor er durch die Ligase I wieder abgespalten wird und zurück zu seinem ursprünglichen Chromosom wandert.

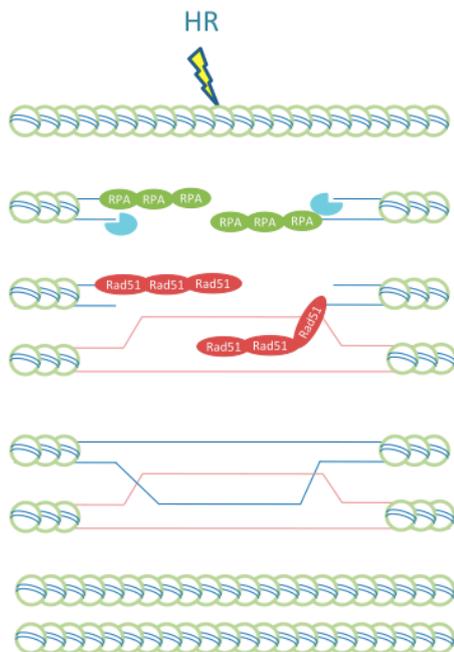


Abbildung 9: Homologe Rekombination schematisch (Quelle: Kakaroukas et al. 2014)

## 1.6 Quantifizierung der Doppelstrangbrüche

Aus der Erkenntnis des Zusammenhangs zwischen DNA-Schäden und Tumorentstehung entwickelte sich in der Folge ein großes Interesse daran, DNA-Doppelstrangbrüche zu quantifizieren. Hierfür gibt es verschiedene Methoden, wie zum Beispiel die Pulsefield-Gelelektrophorese, mit welcher sich DNA-Fragmente

nachweisen lassen, die durch DNA-Doppelstrangbrüche entstanden sind (Löbrich et al. 1993). Eine weitere Methode stellt die klassische Chromosomenanalyse dar, die mittels vorzeitiger Chromosomenkondensation (PCC= premature chromosome condensation) durchgeführt wird. Nach entsprechender Behandlung können die kondensierten Chromosomen dann mikroskopisch beurteilt und die Brüche ausgewertet werden. Allerdings lassen sich aber ungeklärterweise nicht alle DNA-Doppelstrangbrüche auch als Chromosomenbruch darstellen (Bedford und Goodheard 1989, Grudzenski 2009). Außerdem existiert noch die sogenannte TUNEL-Methode (Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) dUTP Nick-End Labeling), bei der die 3'-OH-Enden an den Bruchstellen enzymatisch markiert und durch spezielle Kits anschließend quantifiziert werden können (Hewitson et al. 2006, Kyrylkova et al. 2012). Dieses Verfahren wird zur Quantifizierung von Apoptose-Vorgängen vieler Zellarten genutzt.

Der Comet-Assay, auch Einzelzellgelelektrophorese genannt, ist ein weiteres Verfahren zur Quantifizierung von DNA-Schäden. Ursprünglich wurde er entwickelt, um DNA-Doppelstrangbrüche zu quantifizieren (Östling und Johanson 1984), anschließend aber noch weiterentwickelt, sodass auch Einzelstrangbrüche erkannt werden konnten (Singh et al. 1988). Die durch DNA-Schäden entstandenen Fragmente lassen sich hierbei mittels Gelelektrophorese voneinander trennen und somit quantifizieren.

Den Goldstandard der Quantifizierung stellt aber nach wie vor die von uns verwendete Immunfluoreszenz-Mikroskopie der  $\gamma$ H2AX Foci dar (Takahashi und Onishi 2005), auf die im Folgenden etwas näher eingegangen werden soll.

### **1.6.1 Quantifizierung mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie der $\gamma$ H2AX-Foci**

Die menschliche Erbinformation, die DNA, liegt im Zellkern in Form von langen Chromatinfäden vor. Diese liegen nicht frei im Zellkern herum, sondern sind über die sogenannten Histone organisiert. Dies sind basische Proteine, um welche die saure DNA gewickelt ist. Es gibt mehrere Klassen von Histonen: H1, H2A, H2B, H3 und H4.

Die letzten vier bilden den eigentlichen Nukleosomenkern, der aus einem H3/H4-Tetramer und aus zwei H2A/H2B-Dimeren besteht. H1 sorgt dann für die zusätzliche Komprimierung der DNA. Außer der Organisationsfunktion besitzen die Histone Regulationsfunktionen für Vorgänge an der Erbinformation. So ist beispielsweise die Transkription nur an Bereichen möglich, die histonfrei sind (Emminger und Benz 2005).

Das für unsere Studie bedeutende H2AX ist gleichmäßig über die DNA verteilt und stellt etwa 10% der H2A-Population (Takahashi und Onishi 2005). Außer dem H2AX gibt es in dieser Familie von Histonen noch das H2A1-H2A2 und das H2AZ, wobei das H2A1 den größten Anteil hat.

Durch Bestrahlung der Zell-DNA, zum Beispiel im Rahmen von diagnostischen CT-Untersuchungen, kommt es dann durch die bereits beschriebenen Prozesse und Enzyme zur Phosphorylierung des Serinrests 139 am H2AX. Dieses wird in der Folge in seiner modifizierten Form als  $\gamma$ H2AX bezeichnet (Redon et al. 2002). Diese veränderten Histone lassen sich mittels Immunmarkierung durch einen primären Antikörper, welcher das modifizierte Histon bindet, und den fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper, welcher den primären Antikörper bindet, nachweisen. Mikroskopisch lässt sich anschließend ein jeder DNA-Doppelstrangbruch als ein Focus erkennen (Sedelnikova et al. 2002). Umgekehrt gilt auch, dass der Verlust eines Focus für die Dephosphorylierung und somit die Reparatur eines DNA-Doppelstrangbruches steht (Löbrich et al. 2005). Der große Vorteil dieser Methode ist, dass die  $\gamma$ H2AX Foci bereits bei relativ kleinen Energiedosen, wie sie bei diagnostischen CT-Untersuchungen vorherrschen, entstehen (Rothkamm et al. 2007). Für unsere Studie stellen sie daher einen geeigneten Marker dar.

## 2. Zielsetzung und Fragestellung

### 2.1 Zielsetzung

Die iatrogen verursachte Strahlenexposition durch Computertomographie oder auch Röntgenuntersuchungen ist sowohl für Patienten als auch für die Behandler von immenser Bedeutung, da sie kontrovers diskutiert wird. Aufgrund dieser fortwährenden Diskussionen sind viele Patienten skeptisch gegenüber allen Modalitäten, welche auf Röntgenstrahlung basieren. Dem gegenüber muss gestellt werden, dass die Computertomographie eine der wichtigsten Innovationen in der Medizin der vergangenen Jahrzehnte darstellt (Fuchs und Sox 2001).

Für viele Patienten steht die bildgebende Diagnostik auf der anderen Seite aber auch für moderne Medizin und für hohe Qualität in der medizinischen Versorgung. Dies wird einerseits national durch die hohe Anzahl an CT-Untersuchungen in Deutschland untermauert (Hillenhof 2011, Bundesamt für Strahlenschutz 2012), andererseits aber auch international beispielsweise durch die Zunahme der flächendeckenden Versorgung mit CT-Geräten in den USA (Kalish et al. 2004) oder auch die zunehmende Anwendung von Röntgenstrahlen in Polen (Bekas et al. 2013). Dies untermauert die weltweit zunehmende Bedeutung der Röntgenstrahlung in der medizinischen Diagnostik und verlangt folgerichtig nach einer strengen Kontrolle und Indikationsstellung, wenn man bedenkt, dass die entstehenden Doppelstrangbrüche potenziell mutagen sein können (Zhang 2007). Außerdem verhält sich das Risiko der Karzinogenese nach aktuellem Kenntnisstand nach dem sogenannten linear non-threshold-Modell (LNT-Modell) linear zur Strahlenexposition (Preston 2003), woran sich auch unsere heute gültigen Strahlenschutzprinzipien orientieren.

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie zur Auswertung wurde einerseits gewählt, da sie immer noch den Goldstandard der Foci-Quantifizierung darstellt (Takahashi und Onishi 2005), andererseits die Arbeit mit früheren Arbeiten zu diesem Thema vergleichbarer macht (Geisel et al. 2008, Pathe et al. 2011, Deinzer et al. 2013).

Im Zuge der sich immer weiterentwickelnden Technik ist es wichtig die Ergebnisse der früheren Arbeiten auf deren Aktualität zu überprüfen. Insbesondere die Strahlendosen haben sich im Laufe der letzten Jahre stark verkleinert. So berichteten Pathe et al. noch von Dosen im Bereich von rund 10 mSv, während heutzutage beim CT-Thorax eher Strahlendosen im Bereich von rund 5 mSv verwendet werden (Bundesamt für Strahlenschutz 2012). Sogar an sogenannten minimal-dose Protokollen wird heutzutage gearbeitet (Christe et al. 2013), welche die Strahlenexposition in Zukunft noch weiter reduzieren werden.

Da die Strahlung direkten Einfluss auf die Anzahl von Foci hat (Geisel et al. 2008), sollte mit dem ersten Teil dieser Arbeit überprüft werden, wie sich die Foci-pro-Zell-Zahlen unter den zum Zeitpunkt der Datenerhebung verwendeten Strahlendosen verhalten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte darüber hinaus der Einfluss weiterer Störfaktoren auf die Foci-Zahl nach computertomographischen Untersuchungen untersucht werden. Hierfür wurden die Parameter Alter, BMI und Raucherstatus erhoben und deren Einfluss auf die Foci-pro-Zell-Zahl untersucht, da diese Parameter, jeder isoliert betrachtet, nachweislich mit vermehrten DNA-Schäden korrelieren (Soares et al. 2013, Kocyigit et al. 2011, Donmez-Altuntas et al. 2014).

Zudem sollten so auch mögliche Confounder bei der Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche detektiert werden und die Arbeit somit eine Hilfe für zukünftige Forschung an diesem Thema sein.

## **2.2 Fragestellung**

Im Rahmen dieser Arbeit sollten primär folgende Fragen untersucht und nach Möglichkeit beantwortet werden:

1. Wie verändern sich die Foci-pro-Zell-Zahlen nach Thorax-CT unter aktuellen Strahlungsbedingungen?

2. Wie verhalten sich die Foci-pro-Zell-Zahlen bei nativen und KM-gestützten Untersuchungen im Vergleich?

3. Welchen Einfluss haben die Faktoren Alter, BMI, Raucherstatus auf die Foci-pro-Zell-Zahlen vor und nach Thorax CT?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Computertomograph	Somatom Sensation 64-slice dual-source CT	Siemens Medical Solutions, Forchheim, Deutschland
Computertomograph	Somatom Plus 4 CT	Siemens Medical Solutions, Forchheim, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera	Axio Observer Z1 inverted fluorescence microscope	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop	Leitz DiaLux	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop	Olympus Phase Contrast ULWCD 0,30	Olympus, Japan
Software	Axiovision 4.8.2	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Sterile Werkbank	Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Sterile Werkbank	Modell ET 130V/UV	Ehret, Emmerdingen, Deutschland
Zentrifuge	Labofuge 400	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau, Deutschland

		Deutschland
Gefrierschrank -20°C		Robert Bosch GmbH, München, Deutschland
Kühlschrank 4°C		Liebherr, Biberach am Riss, Deutschland
Inkubationsschüttler	Minitron	Infors GmbH, Einsbach, Deutschland

### 3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Typ	Hersteller
PBS-Lösung (Phosphat buffered saline: 137 mM Na Cl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Dulbeccos PBS	Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, Deutschland
Lymphozyten- Trennmedium	LSM 1077	PAA, Cölbe, Deutschland
Methanol	100% Methanol, technisch	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Aceton	100% Aceton, technisch	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Fluoreszentes Mounting Medium	Roti-Mount FluorCare with DAPI	Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, Deutschland
1%-Triton X-100		Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, Deutschland
Serum	FCS (fetal calf serum)	PAA; Cölbe, Deutschland
Immersionsöl		Carl Zeiss AG, Jena,

		Deutschland
Kontrastmittel	Ultravist 370	Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland

### 3.1.3 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Antikörper/ Farbstoff	Typ	Hersteller
Primärer Antikörper	Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301	Millipore GmbH; Schwalbach a.T., Deutschland
Sekundärer Antikörper	Anti-mouse IgG (H+L), F(ab') <sub>2</sub> Fragment, Alexa Flour 488 Conjugate	Cell Signaling Technology, Inc.; Danvers, USA
Zellkernfarbstoff DAPI	4',6-Diamidino-2- phenylindolehydrochloride	Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, Deutschland

### 3.1.4 Sonstige Materialien

Material	Typ	Hersteller
Monovette	S-Monovette Ammonium- Heparin 5,5ml	Sarstedt AG und Co., Nürnbrecht, Deutschland
Venenpunktionsbesteck	Safety Multifly Set	Sarstedt AG und Co., Nürnbrecht, Deutschland
Objektträger	SuperFrost plus	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser		Menzel, Braunschweig, Deutschland
Leucosep-Röhrchen	Leucosep	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Einmal-Glaspipette		Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Flüssigkeitsblockierender Stift	PAP Pen Liquidblocker	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

## 3.2 Patienten

### 3.2.1 Studienprotokoll und Einverständnis

Das Studienprotokoll wurde vor Durchführung der Studie der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt. Dem Protokoll wurde durch die Ethikkommission zugestimmt.

Alle Patienten wurden vor Durchführung jeglicher Maßnahme über die Studie aufgeklärt. Voraussetzung für die Teilnahme waren das schriftliche Einverständnis des Patienten und die Abwesenheit von Ausschlusskriterien. Zudem wurden im Zuge des Aufklärungsgesprächs die übrigen für die Studie benötigten Daten erhoben (Alter, Körpergröße, Körpergewicht und Raucherstatus).

### 3.2.2 Ein-und Ausschlusskriterien

Eingeschlossen wurden zunächst alle Patienten, die aufgrund klinischer Indikation eine CT-Thorax Untersuchung erhalten sollten.

Ausgeschlossen wurden:

- Patienten mit bekannten Leukämien oder Lymphomen (aktuell sowie in der Vergangenheit diagnostiziert).

- Patienten, die innerhalb der letzten 6 Monate eine Radio- oder Chemotherapie erhalten hatten.
  
- Patienten, die jedwede CT-Untersuchung innerhalb der letzten 3 Monate erhalten hatten.
  
- Patienten, die nicht einwilligungsfähig waren.

### **3.2.3 Patientenkollektiv**

Es wurden im Rahmen unserer Studie insgesamt 225 Patienten untersucht. 172 Patienten erhielten eine CT des Thorax mit Kontrastmittel, bei 53 Patienten wurde eine native CT-Untersuchung des Thorax durchgeführt. Das Kollektiv bestand aus 140 männlichen und 85 weiblichen Patienten, das durchschnittliche Alter betrug 65,1 Jahre.

In einem ersten Schritt wurde das Kollektiv in eine Gruppe mit Kontrastmittel unterstützter (Gruppe 1) und eine Gruppe mit nativer CT-Untersuchung (Gruppe 2) geteilt und diese dann untersucht.

Gruppe 1 bestand aus 105 männlichen und 67 weiblichen Patienten, das Durchschnittsalter betrug 65,3 Jahre.

Gruppe 2 bestand aus 35 männlichen und 18 weiblichen Patienten, das Durchschnittsalter betrug 64,5 Jahre.

In einem zweiten Schritt wurde die Gruppe 1 nach den jeweiligen zu untersuchenden Störgrößen (Alter, BMI, Rauchstatus) weiter unterteilt.

So wurden für die Untersuchung des Einflusses des Alters vier repräsentative Altersgruppen gebildet (40-49 Jahre, 50-59 Jahre, 60-69 Jahre, 70-79 Jahre) und miteinander verglichen.

Für die Untersuchung des Einflusses des BMIs wurden drei Subgruppen gebildet (Gruppe 1: BMI > 18,5 kg/m<sup>2</sup>; Gruppe 2: BMI ≥ 18,5 - 25,0 kg/m<sup>2</sup>; Gruppe 3: BMI > 25,0 kg/m<sup>2</sup>).

Um den Einfluss des Rauchens abschätzen zu können wurde eine Unterteilung in Raucher und Nichtraucher vorgenommen.

### **3.3 Methoden**

#### **3.3.1 Computertomographie**

Bei allen in die Studie eingeschlossenen Patienten lag eine klinische Indikation für die CT-Untersuchung des Thorax vor, die Ein- und Ausschlusskriterien wurden entsprechend beachtet. 172 Patienten erhielten eine Kontrastmittel-unterstützte, 53 Patienten eine native CT-Untersuchung des Thorax.

Bei dem verwendeten Kontrastmittel handelte es sich um Ultravist 370 (Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland), es wurde in einer Menge von 50- 60ml verwendet.

Die verwendeten CT-Geräte waren entweder der Somatom Sensation 64-slice dual-source CT oder der Somatom Plus 4 CT (beide Siemens Medical Solutions, Forchheim, Deutschland).

Folgende Einstellungen und Parameter wurden verwendet:

Eine Röhrenspannung von 100 kV bei einem BMI < 25,0 kg/m<sup>2</sup> bzw. 120 kV bei einem BMI ≥ 25,0 kg/m<sup>2</sup>, eine mittlere Röhrenstromstärke von 2290 mAs (733- 8977 mAs), eine Rotationszeit von 0,5 sec bei einer Matrix von 512 x 512.

Das Dosislängenprodukt wurde als Produkt aus dem volumenbezogenen CT-Dosisindex und der Länge des Scans in jeder Phase bestimmt und betrug im Mittel 30.59 cGy\*cm (6.50- 96.00 cGy\*cm).

### 3.3.2 Blutentnahme

Die Blutentnahmen erfolgten entweder aus bereits liegenden Venenverweilkathetern oder mittels Multifly Venenpunktionsbesteck aus einer oberflächlichen Vene der oberen Extremität. Die erste Blutentnahme erfolgte direkt vor, die zweite direkt nach der CT-Untersuchung. Es wurden pro Abnahme ca. 5ml Blut entnommen und die Proben anschließend in den Ammonium-Heparin-haltigen Monovetten unverzüglich zur Weiterverarbeitung ins Labor transportiert.

### 3.3.3 Aufbereitung der Lymphozyten

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Vorgänge bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zunächst wurden die Lymphozyten aus der Blutprobe isoliert. Hierfür wurde die Blutprobe vorsichtig mittels einer Pipette auf das Lymphozyten- Trennmedium geschichtet. Die Gewinnung der Lymphozyten erfolgte dann nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation: Die Probe wurde mit 2800 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten und ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Anschließend konnten die Lymphozyten mit einer Glaspipette aus der Interphasenbande gewonnen und in ein Röhrchen gegeben werden. Danach wurden die Lymphozyten gereinigt. Hierfür wurden 10 ml PBS-Lösung in das Röhrchen hinzugegeben und anschließend für 5 Minuten bei eingeschalteter Bremsen und 250 x g wieder abzentrifugiert. Das Lymphozytenpellet verblieb danach am Boden des Röhrchens, sodass die Reinigungslösung abdekantiert werden konnte. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt.

Anschließend wurden 3ml PBS-Lösung zu dem Lymphozyten-Pellet gegeben und mithilfe der Pipette vorsichtig zu einer homogenen Suspension vermischt. Von dieser Suspension wurden 3 µl auf einen Objektträger gegeben. Dieser war mit dem flüssigkeitsblockierenden Stift vorbehandelt worden, sodass die Probe nicht zerlaufen konnte. Unter dem Lichtmikroskop wurde die Zelldichte kontrolliert und die Probe gegebenenfalls noch weiterverdünnt. Die Proben wurden dann über Nacht bei Raumtemperatur unter der Sterilbank getrocknet.

Am nächsten Tag wurden die Proben für 20 min mit eiskaltem 100% igem Methanol und anschliessend 1 min in eiskaltem 100% igem Aceton fixiert. Beides erfolgte bei -20°C im Gefrierschrank. Anschließend konnten die Proben bis zur weiteren Verarbeitung im Gefrierschrank bei -20°C gelagert werden.

### **3.3.4 Immunfluoreszenzfärbung**

Vor der eigentlichen Färbung wurden die Proben zunächst in PBS-Lösung gegeben und für 10 Minuten im Inkubationsschüttler vorinkubiert. Anschließend wurde die PBS-Lösung abgegossen und der Vorgang insgesamt dreimal wiederholt. Nun wurden die Proben in einer Lösung bestehend aus PBS und 1%-Triton X-100 für 15 Minuten geschüttelt und dadurch die Zellkerne permeabilisiert. Danach wurden in den Proben die freie DNA geblockt, dies geschah durch Zugabe von fetalem Kälberserum, dessen Konzentration in der Lösung dann 10% betrug. Die Proben wurden für mindestens eine Stunde im Inkubationsschüttler mit der Lösung inkubiert.

Anschließend wurden die Proben wiederum dreimal für 10 Minuten in PBS-Lösung gewaschen.

Pro Probe wurden nun 50µl des primären Antikörpers, Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301, in einer 1:400-Verdünnung, versetzt in PBS-Lösung, aufgebracht und in einer feuchten Inkubationskammer für Objektträger über Nacht bei 8°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der ungebundene Antikörper durch mehrmaliges Auswaschen in PBS-Lösung entfernt.

Nun wurden die Proben für 45 Minuten mit dem sekundären Antikörper, Anti-mouse IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> Fragment, Alexa Flour 488 Conjugate, im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Hierfür wurden wieder 50µl des Antikörpers in einer 1:400-Verdünnung in PBS-Lösung verwendet und die Proben in der Inkubationskammer vor Licht geschützt.

Daran schloss sich wiederum das Entfernen des ungebundenen Antikörpers an, zum Schutz vor Licht wurde das Behältnis beim Auswaschen mit Alufolie umwickelt. Das Auswaschen im Dunkeln wurde insgesamt dreimal wiederholt.

Die überschüssige PBS-Lösung auf den Objektträgern wurde um die Proben herum vorsichtig entfernt. Die Proben wurden anschließend mit einem DAPI-haltigem Fluoreszenz-Eindeckmedium eingedeckelt und bis zum Mikroskopieren lichtgeschützt und bei Raumtemperatur in Objektträgermappen verwahrt.

### **3.3.5 Fluoreszenzmikroskopie**

Für die Mikroskopie wurde ein Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera verwendet, das Axio Observer Z1 inverted fluorescence microscope (Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Hiermit wurde die Anzahl von fluoreszierenden Foci pro Zelle der jeweiligen Probe bestimmt, die als Maß für den DNA-Schaden herangezogen wurden.

Pro Probe wurden bei 630-facher Vergrößerung mindestens 200 unterschiedliche Zellkerne betrachtet und fotografiert. Hierfür wurden mithilfe der CCD-Kamera und der Axiovision-Software zwischen 4 und 12 Bilder von unterschiedlichen Arealen der Probe gemacht. Es wurden zunächst Aufnahmen mit dem FITC-Filter gemacht, welcher vor allem die Foci visualisiert, die als grüne Punkte gesehen werden konnten. Danach wurde eine Aufnahme desselben Ausschnitts mithilfe des DAPI-Filters gemacht, mit welchem die Zellkerne blau dargestellt werden können. Mithilfe der Axiovision-Software wurden anschließend beide Bilder übereinander gelegt, sodass nun erkannt werden konnte, bei welchen Foci es sich um echte, zellkernständige Foci handelte. So konnten ungebundene und nicht ausgewaschene Reste des sekundären Antikörpers erkannt und von Foci unterschieden werden.

Granulozyten und Monozyten wurden nach morphologischen Kriterien erkannt und von der Auswertung ausgeschlossen.

Um eine möglichst genaue Auswertung der Bilder durchzuführen, wurden diese zweimalig und durch zwei unabhängig voneinander arbeitende Auswerter

durchgeführt. Beide hatten mindestens 2 Jahre Erfahrung in dieser Art der Auswertung und waren bezüglich des Zeitpunktes der Probengewinnung und auch bezüglich der Patientendaten verblindet.

### **3.3.6 In-vitro Kontrollen**

Bei jeder Färbung wurde ein in-vitro bestrahltes Präparat als Positiv-Kontrolle zum Ausschluss einer insuffizienten Färbung mitgefärbt.

Diese Positiv-Kontrollen wurden folgendermaßen hergestellt:

Zunächst wurden 1,5 ml einer Blutprobe mit 1,5 ml PBS-Lösung gemischt und anschließend mit 500 mGy bestrahlt. Die Dosis wurde auf 14 Einzeldosen mit jeweils 36 mGy aufgeteilt. Die verwendete Röhrenspannung betrug 102 kV, der Abstand zwischen Probe und Röntgenröhre (AXIOM Multix 'MT, Röhre Opti 150/30/50, Siemens AG, Erlangen, Deutschland) betrug 2 cm. Kontrolliert wurde die Dosis mithilfe eines Dosimeters (DIADOS type 11003-0178: PTW GmbH, Freiburg, Deutschland).

Direkt nach der Bestrahlung wurden die in-vitro Kontrollen nach demselben Schema aufbereitet wie die in-vivo Proben.

### **3.4 Statistische Auswertung**

Ziel der statistischen Auswertung war es, signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit nativem und kontrastmittelunterstütztem CT, zwischen den verschiedenen Alters- und BMI-Gruppen und schließlich zwischen Rauchern und Nichtrauchern in den Foci-pro-Zell-Raten festzustellen. Zunächst wurden die Mittelwerte der jeweiligen Daten berechnet, hierfür wurde das arithmetische Mittel verwendet. Für die statistische Auswertung wurde für die jeweiligen Mittelwerte der Datenpaare ein zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt, um eine statistische Signifikanz nachzuweisen bzw. die Nullhypothese ablehnen zu

können. Bei einem Signifikanzniveau von 5% und einem Konfidenzintervall von 95% wurde von einem statistisch signifikanten Unterschied nur bei einem p-Wert  $< 0,05$  ausgegangen. Desweiteren wurden jeweils die Standardabweichungen der erhaltenen Daten berechnet, um die Streuung der Daten um die Mittelwerte abschätzen zu können und somit eine Aussage über die Genauigkeit der Methode treffen zu können. Dies schien insbesondere sinnvoll in Hinblick auf die großen Standardabweichungen in den vorherigen Studien zu dieser Thematik. Als Software zur Datenverwaltung und -organisation wurde Microsoft Excel 2010 verwendet. Auch die Berechnungen wurden mit diesem Programm durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Allgemeine Betrachtung und Patientengut

Bei dieser Studie diente jeder durch Immunfluoreszenz dargestellte Focus zum Nachweis eines DNA-Doppelstrangbruches. Das mittlere Dosislängenprodukt (DLP) betrug 30,59 cGy\*cm (6.50- 96.00 cGy\*cm). Zwischen den Kohorten mit Kontrastmittel (im Folgenden als "mit KM" bezeichnet) und ohne Kontrastmittel (im Folgenden als "nativ" bezeichnet) gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Dosislängenprodukte (mit KM 30,31 cGy\*cm; nativ 31,51 cGy\*cm; p= 0,57).

<b><u>Patienten-</u> <u>charakteristika</u></b>	"nativ"	"mit KM"	total
Patientenzahl	53	172	225
Geschlecht (männlich/ weiblich)	35/18	105/67	140/85
Alter (in Jahren)	64,5 ± 15,5	65,3 ± 13,9	65,1 ± 14,2
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28 ± 6	26 ± 5	27 ± 5
Raucher	9	52	61
DLP (cGy*cm)	31,51 ± 13,60	30,31 ± 13,06	30,59 ± 13,17

Tabelle 1: Übersicht Patientenmerkmale

### 4.2 Veränderung der Foci-Zahl durch die CT-Untersuchung

Alle Foci-pro-Zell-Raten sind im Folgenden auf ihr jeweiliges DLP normiert und beziehen sich damit auf 1 cGy\*cm. In der Gruppe "mit KM" betrug das sogenannte mittlere Hintergrundfocuslevel im Mittel 0,00751 Foci pro Zelle. In der Gruppe "nativ" betrug das Level im Durchschnitt 0,00671 Foci pro Zelle.

#### 4.2.1 Einfluss des Kontrastmittels

Es wurden insgesamt 225 CT-Thorax-Patienten untersucht. 172 Patienten erhielten Kontrastmittel während ihrer Untersuchung, bei 53 wurde die Untersuchung nativ durchgeführt. Bei dem verwendeten Kontrastmittel handelte es sich um Ultravist 370 (Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland). Es wurde den Patienten entweder 50 oder 60 ml Kontrastmittel intravenös verabreicht.

<b><u>Durchschnittliche Foci-pro-Zell-Rate</u></b>	Vor CT	Nach CT
mit KM (n= 172)	0,00751	0,00800
nativ (n=53)	0,00683	0,00668

Tabelle 2: Einfluss des Kontrastmittels auf die Foci pro Zelle

Die Gruppe "mit KM" wies nach CT 20% höhere Foci-Zahlen auf, als die Gruppe "nativ", jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant ( $p= 0,44$ ). In der Gruppe "mit KM" stieg die Foci-Zahl im Mittel um 0,0005 Foci pro Zelle nach der CT-Untersuchung ( $p= 0,70$ ). In der Gruppe "nativ" sank die durchschnittliche Foci-Zahl pro Zelle sogar minimal um 0,00015, wobei auch hier der Unterschied zwischen prä- und post-CT nicht statistisch signifikant war ( $p= 0,96$ ).

Es konnten Unterschiede beobachtet werden zu den Patienten, die extrem hohe Dosislängenprodukte erhalten hatten. So wiesen Patienten, die ein Dosislängenprodukt von  $\geq 50,0$  cGy\*cm erhalten hatten, mit durchschnittlich 0,00116 mehr Foci pro Zelle 4,1-mal höhere Foci-pro-Zell-Raten auf als Patienten, die ein Dosislängenprodukt  $< 50,0$  cGy\*cm erhalten hatten und einen Zuwachs von 0,00028 Foci pro Zelle zeigten. Allerdings war auch dieser Effekt nicht statistisch signifikant ( $p= 0,41$ ).

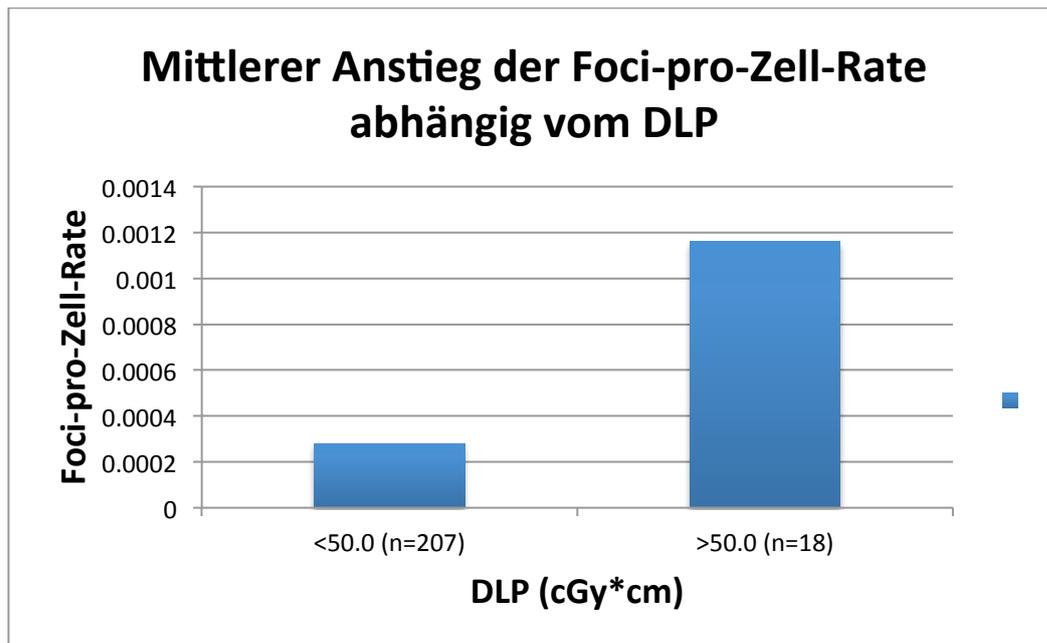


Diagramm 1: Anstieg der Foci-pro-Zell-Rate abhängig vom DLP

### 4.3 Einfluss von Störfaktoren in der Kontrastmittelgruppe

Im Zuge dieser Studie sollten im Unterschied zu vorherigen Arbeiten noch weitere Faktoren, die einen möglichen Einfluss auf die Foci-Zahl haben und somit das Studienergebnis beeinflussen konnten, untersucht und bewertet werden. Dazu wurde hier nur die Gruppe "mit KM" untersucht, da in der Gruppe "nativ" die einzelnen Subgruppen sehr klein und damit durch einzelne Ausreißer zu stark beeinflusst wurden.

#### 4.3.1 Einfluss des Alters

Für die Untersuchung des Einflusses des Alters wurde die Gruppe "mit KM" in vier Untergruppen unterteilt:

Gruppe 1: 40-49-jährige (n=9)

Gruppe 2: 50-59-jährige (n= 30)

Gruppe 3: 60-69-jährige (n= 43)

Gruppe 4: 70-79-jährige (n= 61)

Diese Gruppen wurden ausgewählt, da sie von den Fallzahlen her am bedeutendsten waren.

Es fiel ein Anstieg der Foci-Zahlen sowohl vor als auch nach der CT-Untersuchung mit ansteigendem Alter auf.

Altersgruppen	Foci-pro-Zelle prä CT	Foci-pro-Zelle post CT
Gruppe 1	0,00304207	0,003237386
Gruppe 2	0,005056741	0,00538032
Gruppe 3	0,006142496	0,0067742
Gruppe 4	0,010134973	0,010293912

Tabelle 3: Foci-pro-Zell-Raten der Altersgruppen

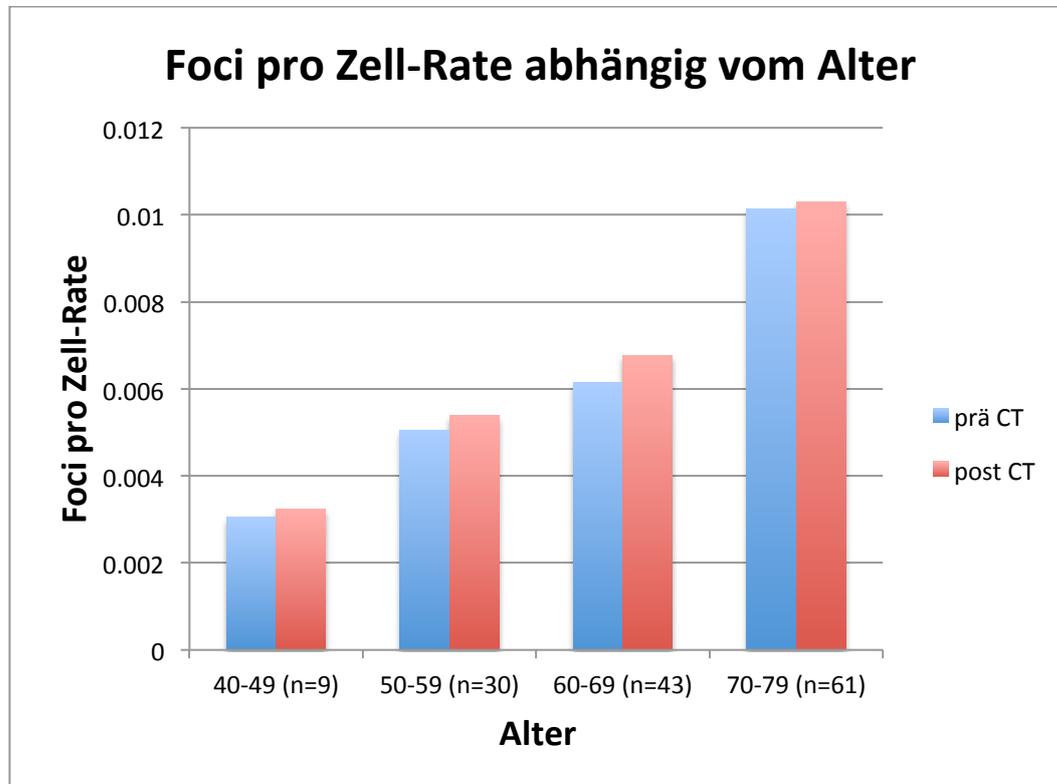


Diagramm 2: Säulendarstellung der Foci pro Zell-Raten nach Altersgruppen

Die Gruppe 1 hatte vor der CT-Untersuchung statistisch signifikant kleinere Foci pro Zell-Raten als die anderen Alterklassen ( $p= 0,0092$ ). Nach der CT-Untersuchung war zwar immer noch ein Unterschied zu den anderen Gruppen messbar, aber dieser war nicht mehr statistisch signifikant ( $p= 0,0511$ ). Der Unterschied zwischen den anderen Gruppen war zwar ebenfalls messbar, statistisch jedoch nicht signifikant.

#### 4.3.2 Einfluss des BMI

Allein die Tatsache, dass bei Patienten mit hohem BMI eine höhere Strahlendosis benötigt wird, um vergleichbare Bildqualitäten zu erhalten (Schindera et al. 2008), weist auf Unterschiede im Strahlenabsorptionsverhalten des größeren Körperumfangs bei adipösen Patienten im Vergleich mit Normalgewichtigen hin. Um eine Aussage über den Einfluss auf die Foci-Zahl treffen zu können wurde die Gruppe "mit KM" gemäß der BMI-Klassifikation in drei Subgruppen unterteilt:

Gruppe 1: Untergewicht ( $\text{BMI} < 18,5 \text{ kg/m}^2$ )

Gruppe 2: Normalgewicht ( $\text{BMI} 18,5 - 24,9 \text{ kg/m}^2$ )

Gruppe 3: Übergewicht ( $\text{BMI} 25,0 - 40,0 \text{ kg/m}^2$ )

Zwei Patienten, die ein extremes Übergewicht ( $\text{BMI} > 40,0 \text{ kg/m}^2$ ) aufwiesen, wurden nicht berücksichtigt, da ihr Strahlenabsorptionsverhalten nicht als repräsentativ gewertet werden kann und die Anzahl der Patienten in diesem BMI-Bereich im klinischen Alltag auch eher klein ist.

Es ist des Weiteren zu beachten, dass sich die verwendeten Dosislängenprodukte der drei Gruppen signifikant unterschieden.

So erhielt die Gruppe 1 durchschnittlich eine Dosislängenprodukt von  $12,08 \pm 6,42 \text{ cGy*cm}$ . Die Gruppe 2 erhielt mit  $21,06 \pm 8,16$  im Schnitt ein 1,7-fach höheres Dosislängenprodukt als die Gruppe 1. Die Dosislängenprodukte der beiden Gruppen unterschieden sich statistisch signifikant ( $p= 0,013$ ).

Die Gruppe 3 erhielt mit  $36,12 \pm 11,90$  cGy\*cm durchschnittlich ebenfalls ein 1,7-fach höheres Dosislängenprodukt als die Gruppe 2, auch hier war der Unterschied zwischen den Gruppen statistisch signifikant ( $p= 3,3 \times 10^{-7}$ ).

BMI-Gruppen	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Mittleres DLP $\pm$ Standardabweichung (cGy*cm)	$12,08 \pm 6,42$	$21,06 \pm 8,16$	$36,12 \pm 11,90$

Tabelle 4: Mittlere Dosislängenprodukte der BMI-Gruppen

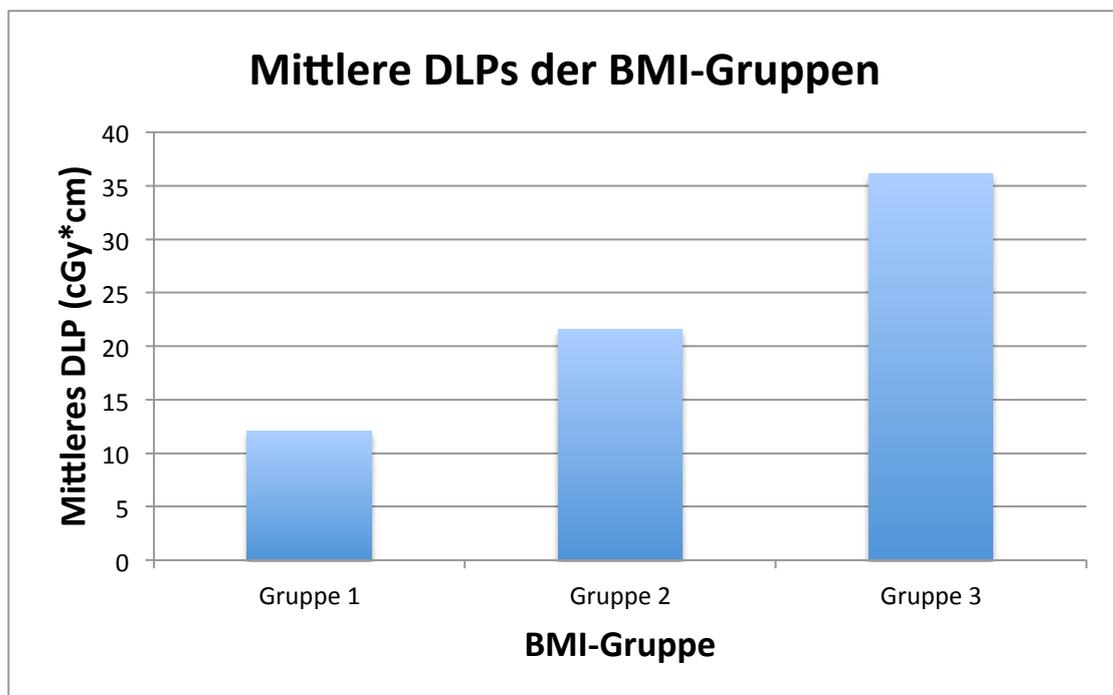


Diagramm 3: Mittlere verwendete Dosislängenprodukte nach BMI-Gruppe im Säulendiagramm

Nach der CT-Untersuchung zeigte sich vor allem in der Gruppe 1 eine starke Erhöhung der Foci-pro-Zell-Raten. Die Patienten wiesen durchschnittlich 1,8-fach mehr Foci pro Zelle auf, als vor der Untersuchung. Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant ( $p= 0,496$ ). Patienten der Gruppe 3 wiesen einen annähernd gleichen Foci-Zuwachs auf wie Patienten der Gruppe 2, der Unterschied betrug im Mittel 0,0004 mehr Foci pro Zelle. Der Unterschied war dementsprechend statistisch nicht signifikant ( $p= 0,581$ ).

Allerdings fiel auf, dass Patienten der Gruppe 3 sowohl prä-CT ( $p= 0,0019$ ) als auch post-CT ( $p= 0,0002$ ) signifikant kleinere Foci-Zahlen als Patienten der Gruppe 2 aufwiesen.

<b>BMI-Gruppe</b>	<b>Foci/Zelle prä-CT</b>	<b>Foci/Zelle post-CT</b>
Gruppe 1	0,009855658	0,018518624
Gruppe 2	0,011743515	0,012270343
Gruppe 3	0,003722494	0,004292724

Tabelle 5: Durchschnittliche Foci pro Zelle nach BMI-Gruppe

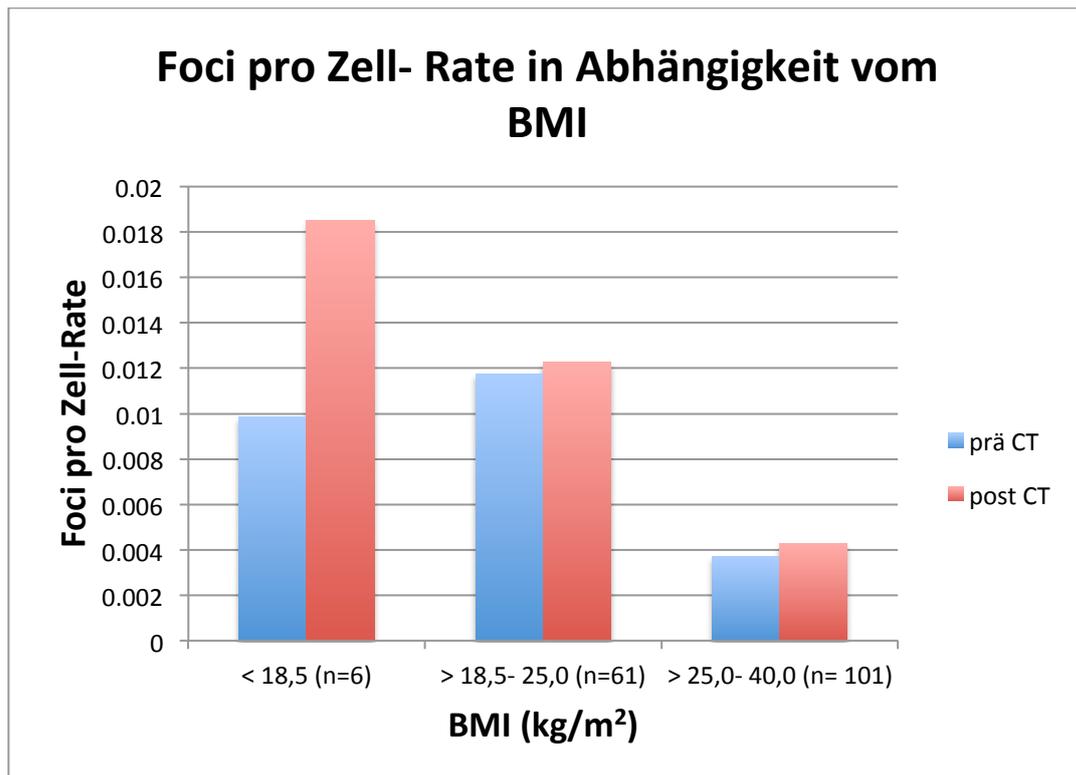


Diagramm 4: Durchschnittliche Foci/Zell-Raten nach BMI im Balkendiagramm

#### 4.3.3 Einfluss des Raucherstatus

Um den Einfluss des Raucherstatus auf die Anzahl der Foci und damit auf die Zahl der Doppelstrangbrüche zu überprüfen, wurde die Gruppe "mit KM" in die Subgruppen "Raucher" und "Nichtraucher" unterteilt. Es ist zu beachten, dass es unter den Rauchern große Unterschiede im Rauchverhalten gab, welche sehr schwierig zu quantifizieren waren. Die Einheit "pack-years" (Anzahl der Jahre, in denen ein Raucher eine Schachtel Zigaretten pro Tag geraucht hat) konnte nicht zuverlässig erhoben werden und wurde deshalb verworfen. Auch alle ehemaligen Raucher wurden in die Gruppe "Raucher" eingeordnet, da sie ein sehr heterogenes Rauchverhalten in der Vergangenheit gezeigt hatten und eine weitere Unterteilung in Subgruppen nicht sinnvoll möglich war.

Das durchschnittliche Dosislängenprodukt der Raucher betrug  $28,75 \pm 12,78$  cGy\*cm, das der Nichtraucher  $30,75 \pm 13,17$  cGy\*cm, der Unterschied war

statistisch nicht signifikant ( $p= 0,306$ ). Auch die Hintergrundfocuslevels beider Gruppen unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander ( $p=0,827$ ).

Raucher zeigten im Schnitt einen Zuwachs von 0,00074 Foci pro Zelle nach der CT-Untersuchung. Dies entsprach dem 1,9-fachen Wert des durchschnittlichen Zuwachses bei den Nichtrauchern mit 0,00039 mehr Foci pro Zelle. Allerdings war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ( $p= 0,719$ ).

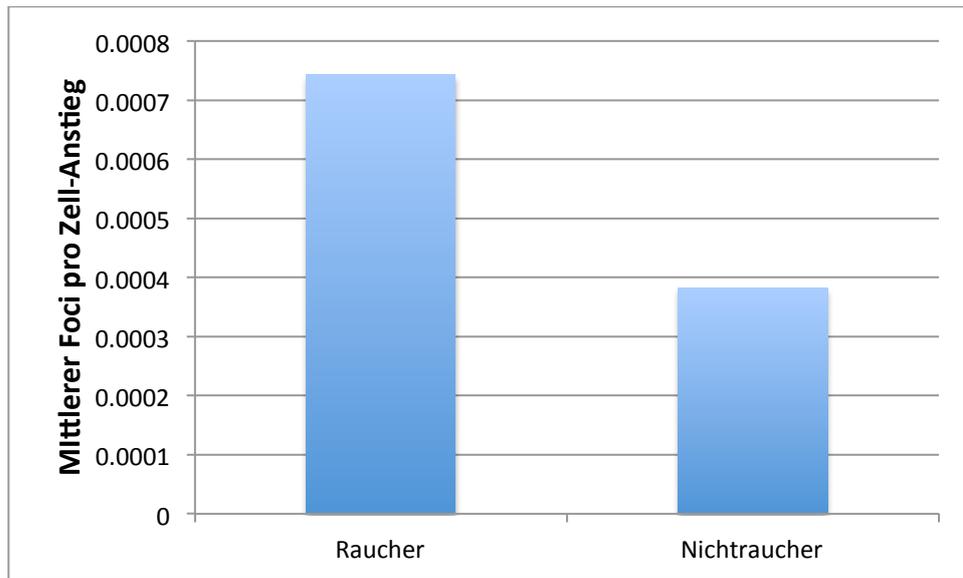


Diagramm 5: Vergleich des mittleren Foci-pro-Zell-Anstiegs zwischen Rauchern und Nichtrauchern im Balkendiagramm

## 5. Diskussion

### 5.1 Bedeutung der Studie

Die Themen Strahlenexposition und Strahlenschutz sind heute mehr denn je von besonderer Bedeutung, verfügen wir doch im Zuge des sich immer schneller entwickelnden Fortschrittes über ganz andere technische Möglichkeiten als noch vor 10 Jahren. Das Reduzieren der Strahlenexposition stellt hierbei kein Luxusproblem mehr dar, sondern ist im Gegenteil essentieller Bestandteil der modernen Medizin, gerade vor dem Hintergrund der immer weiter steigenden CT-Untersuchungszahlen. Ein weiterer Ausdruck davon, wie ernst das Thema Strahlenschutz in der Medizin genommen wird, ist die sinkende Strahlenexposition des beruflich exponierten Personals aufgrund verbesserter Strahlenschutzmaßnahmen. Die durchschnittliche Strahlenexposition von beruflich strahlenbelastenden Personen ging zwischen 2011 und 2012 um den stolzen Wert von 10% zurück, somit liegt die mittlere Jahresdosis der beruflich Strahlenexponierten aktuell bei 0,52 mSv (Bundesamt für Strahlenschutz).

Tumorentstehung durch diagnostische Röntgenstrahlung ist schon seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung. Der Zusammenhang ist nicht mehr zu bestreiten, gerade im Hinblick auf CT-Untersuchungen gibt es einige Arbeiten, welche dies untermauern (Davis et al. 2011, Choi et al. 2013).

Das Thema ist auch deshalb von solcher Bedeutung, weil es eins der vielen Kontrollrädchen in der multifaktoriellen Tumorentstehung darstellt, welches wir, aus unserer heutigen Sicht zumindest, relativ einfach selber bedienen und regulieren können. Die medizinisch-diagnostisch eingesetzte Strahlung stellte 2012 mit 1,9 mSv einen großen Anteil der 4,0 mSv Gesamtstrahlenexposition, der ein Mensch pro Jahr ausgesetzt ist (Bundesamt für Strahlenschutz). Dies unterstreicht die Bedeutung dieses Kontrollrädchens, genauso der Fakt, dass das CT eine der bedeutendsten

Erfindungen der letzten Jahrzehnte darstellt (Fuchs 2001). Für Ärzte wie auch für Patienten gehören CT-Untersuchungen inzwischen zum klinischen Alltag. Umso wichtiger ist es, dieses heute ubiquitäre Diagnostikum der modernen Medizin richtig einordnen zu können, potentiell davon ausgehende Risiken und Gefahren zu erkennen und schließlich zu minimieren.

Die Studie ist eine aus einer Reihe von ähnlichen Studien zu diesem Thema, die dieselbe Methodik nutzen, denen aber leicht abgeänderte Fragestellungen zugrunde liegen (Löbrich 2005, Geisel 2008, Grudzinski 2009, Pathe 2011). Außerdem arbeiteten diesen Studien mit wesentlich kleineren Patientenzahlen als die vorliegende Arbeit. Mit unserer Studie sollten die bisherigen Ergebnisse nachvollzogen werden, zum Einen im Hinblick auf die größeren Fallzahlen, zum Anderen sollte aber auch der rasante technische Fortschritt über die letzten Jahre, welcher zu einer bedeutenden Dosisreduktion geführt hatte, berücksichtigt werden. Auch die Labormethodik hat sich im Vergleich zu den anderen Studien durchaus verändert und weiterentwickelt.

Eine weitere Besonderheit unserer Arbeit liegt im zweiten Teil der Auswertung. Hier ist das Augenmerk auch auf andere Störfaktoren mit potentiell schädigendem Einfluss auf die DNA wie das Alter, den BMI und den Raucherstatus gerichtet. Es sollten somit mögliche Confounder ausgemacht und deren Einfluss diskutiert werden.

## **5.2 Diskussion der $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie als Methode**

Die DNA-Doppelstrangbrüche sind, die für die Tumorentstehung entscheidenden Strahlenschäden an der Zelle. Zhang et al. berichteten 2008 von dem steigenden Tumorrisiko durch DNA-Doppelstrangbrüche und vor allem deren gestörter Reparatur. Die  $\gamma$ H2AX-Foci repräsentieren die DNA-Doppelstrangbrüche wie kein zweiter Marker (Rothkamm und Löbrich 2003), sie werden an den Stellen der

Doppelstrangbrüche exprimiert und lassen sich mit relativ wenig Aufwand nachweisen.

Die Rolle der  $\gamma$ H2AX-Foci ist dabei schon seit rund 15 Jahren bekannt (Rogakou et al. 1998, Paull et al. 2000, Chen et al. 2000), über die letzten 10 Jahre hat die Immunfluoreszenzmikroskopie der Foci weiter an Bedeutung gewonnen. Viele Arbeiten griffen auf diese Methode zurück, da sie die Anzahl der Doppelstrangbrüche direkt darstellen kann (u.a. Sedelnikova 2002, Pilch 2003, Löbrich 2005, Geisel 2008, Grudzinski 2009, Pathe 2011).

Die Verwendung von Lymphozyten-Zellkernen als Untersuchungsmaterial hat den Vorteil, dass Lymphozyten im klinischen Alltag sehr schnell und wenig invasiv gewonnen werden können. Daher eignet sich diese Methode auch zur Akquisition großer Fallzahlen in relativ kurzer Zeit. Allerdings muss auch bedacht werden, dass im Zuge des technischen Fortschrittes, zum Beispiel der Einführung mehrzeiliger CT-Geräte (Prokop 2003), die Bestrahlungsdauer über die letzten Jahre wesentlich zurückgegangen ist. Dies impliziert, dass eine immer geringere Anzahl der im Blut zirkulierenden Lymphozyten der Strahlung ausgesetzt ist und somit die Foci-Zahl der peripher gewonnen Lymphozyten die Strahlenschäden eventuell nicht ganz korrekt widerspiegelt. Auch der Verdünnungseffekt der geschädigten Lymphozyten führt eher zu einem Unterschätzen der Anzahl an Doppelstrangbrüchen (Pathe 2011).

Ebenso muss erwähnt werden, dass in der vorliegenden Arbeit genau wie in den vorangehenden Studien sehr hohe Standardabweichungen der Foci-Zahlen vorlagen, was für sehr heterogene Verhältnisse unter den Patienten bezüglich der durch Strahlung entstehenden Doppelstrangbrüche spricht. Es lagen aber auch schon vor der CT- Untersuchung sehr heterogene Anzahlen an Doppelstrangbrüchen vor. Die meisten Patienten, die nach der Untersuchung eine große Menge von Foci aufwiesen, hatten also auch schon vor der Untersuchung eine höhere Anzahl an Strangbrüchen. Dies ist mit gestörten DNA-Reparaturmechanismen oder anderen störenden Einflüssen, welchen die DNA ständig unterliegt (UV-Licht, Noxen aus Ernährung oder Luft), vereinbar.

Ein weiterer Nachteil der Immunfluoreszenzmikroskopie ist Auswertung per Auge. Diese ist vom Untersucher abhängig, da es keine exakte Definition eines Focus gibt. Vor allem eine hohe Anzahl an Doppelstrangbrüchen, die sich durchaus sehr

heterogen im Sinne von grünen Punkten verschiedener Größe darstellen, macht es zunehmend schwieriger einen "wahren" Doppelstrangbruch von einem im Vergleich etwas kleineren Färbeartefakt, welches sich auf einen Zellkern projiziert, zu unterscheiden. Umgekehrt kann dasselbe Färbeartefakt in einem sehr Foci-armen Bild eher als Doppelstrangbruch fehlinterpretiert werden. Es darf auch nicht vergessen werden, dass sich an jedem Doppelstrangbruch das  $\gamma$ H2AX Signal über eventuell verschieden viele Megabasenpaare ausbreitet und sich die Foci dadurch natürlich in variabler Größe präsentieren können. All diese Punkte machen die Auswertung sehr untersucherabhängig und erschweren sowohl Auswertung als auch Vergleiche zwischen den verschiedenen Arbeiten.

### **5.3 Diskussion der Studienergebnisse**

Bei 225 Patienten mit indiziertem Thorax-CT bestimmten wir die Anzahl der Foci mittels der  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie. 172 Patienten bekamen eine Kontrastmittel-unterstützte Untersuchung, 53 Patienten durchliefen die Untersuchung ohne Kontrastmittel. Ziel war es die vorhandene Datenlage vor dem Hintergrund neuer technischer Entwicklungen kritisch zu überprüfen und zusätzlich weitere mögliche Störfaktoren auszumachen. Im Folgenden beziehen sich die Angaben auf die nicht-normierte reine Zahl der Foci pro Zelle, um die vorliegenden Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Studien vergleichbarer zu machen.

#### **5.3.1 Diskussion des Einflusses von CT und Kontrastmittel auf die Anzahl der DNA-DSBs**

Für die Erhebung der Daten wurde jedem Patienten an zwei Zeitpunkten Blut abgenommen, einmal direkt vor der CT-Untersuchung und ein zweites Mal direkt im Anschluss an die Untersuchung. Danach wurden die Proben unverzüglich weiterverarbeitet.

Ein erster Unterschied zu früheren Arbeiten ist das sogenannte

Hintergrundfocuslevel, es steht für die Anzahl an Doppelstrangbrüchen, die bereits vor der CT-Untersuchung vorlagen. Die Arbeiten von Löbrich et al. (2005), Geisel et al. (2008) und auch Pathe et al. (2011) beschreiben alle ein exakt gleiches Hintergrundlevel von durchschnittlich 0,05 Foci pro Zelle. In der vorliegenden Arbeit erhielten wir allerdings einen nicht normierten Wert von durchschnittlich 0,183 Foci pro Zelle, was fast dem Vierfachen dieses Wertes entspricht. Nachdem systematische Fehler gründlich ausgeschlossen wurden, kann dies nun verschiedene Gründe haben. Zum einen sind die extrem hohen Standardabweichungen zu beachten, welche die Heterogenität der Foci-Zahlen ausdrücken. Auch bei Pathe et al. und Grudzinski et al. wurden sehr hohe Standardabweichungen beobachtet und diskutiert. So betrug das durchschnittliche Hintergrundfocuslevel beispielsweise bei Pathe et al.  $0,048 \pm 0,04$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), was einer Schwankung von ca. 90% um den Mittelwert entspricht.

Auch in der vorliegenden Arbeit lag die Standardabweichung des Hintergrundfocuslevels bei den nicht-normierten Werten bei über 100% ( $0,183 \pm 0,239$  Foci pro Zelle), was eben Ausdruck der sehr großen Heterogenität der Werte ist.

Zum anderen ist die Auswertung mit dem Auge sehr subjektiv und gerade bei einer sehr großen Anzahl von Foci ist diese Form der Auswertung fehlerbehaftet. Es gibt keine allgemein gültige Definition oder Mindestgröße eines echten Focus, sodass es hier durchaus zu Abweichungen der Zählungen zwischen verschiedenen Untersuchern kommen kann. Verlässlicher hingegen sind die Veränderungen der Focuslevel eines Patienten prä CT im Vergleich zu post CT, da hier derselbe Untersucher zweimal dieselben Auswertekriterien anwendet.

Auch deshalb erscheint es auf den zweiten Blick verwunderlich, dass in allen früheren Arbeiten mit dieser Methode derselbe Wert für das Hintergrundfocuslevel erhalten wurde. Auch in Hinblick darauf, dass sehr unterschiedliche Patientenzahlen verwendet wurden. Bei Löbrich et al. waren es 23 Patienten, Geisel et al. arbeiteten mit lediglich 5 Patienten und bei Pathe et al. wurden von 47 Patienten die Daten erhoben. Bei einer kleineren Anzahl an Patienten haben einzelne Ausreißer ein viel größeres Gewicht und beeinflussen den Gesamtdurchschnitt sehr stark, was sich dann in unterschiedlichen Mittelwerten der Focuslevel ausdrücken sollte. Die

gleichen Focuslevels widersprechen außerdem auch der These der verschiedenen ausgeprägten DNA-Reparaturmechanismen in unterschiedlichen Patienten (Ismail 2007), deren logische Konsequenz eigentlich eine nicht zu vergleichende Anzahl an Doppelstrangbrüchen unter den Patienten der Studien sein müsste. Eigentlich müssten Patienten demzufolge sowohl vor CT als auch nach CT ganz unterschiedliche Zahlen von Strangbrüchen aufweisen, die DNA unterliegt in unserem Alltag einer ständigen reparaturwürdigen Schädigung, zum Beispiel während der Replikation. Dies drückt sich in den von uns bestimmten sehr großen Standardabweichungen aus.

In früheren Arbeiten konnte ein signifikanter Effekt der CT-Untersuchung auf die Anzahl der entstehenden Foci nachgewiesen werden. So erhielten Löbrich et al. einen Anstieg auf Foci-Werte zwischen 0,1 und 0,4 Foci pro Zelle abhängig vom Dosislängenprodukt (genaue Mittelwerte und Standardabweichungen wurden nicht angegeben), Geisel et al. einen Anstieg auf Werte zwischen 0,15 und 0,45 Foci pro Zelle ebenfalls abhängig vom Dosislängenprodukt und Pathe et al. einen Anstieg des Mittelwertes auf  $0,153 \pm 0,107$  Foci pro Zelle nach CT.

In der vorliegenden Studie gab es ebenfalls einen minimalen Anstieg der Doppelstrangbrüche, jedoch nur um durchschnittlich 0,004 pro Zellkern und dieser Anstieg war im Gegensatz zu früheren Studien statistisch auch nicht signifikant ( $p=0,86$ ).

Das bedeutet, dass der schädigende Einfluss der CT-Untersuchung zumindest mittels der Immunfluoreszenzmikroskopie nicht mehr nachzuweisen ist. Eine Begründung dafür sind sicherlich die über die letzten Jahre abnehmenden Strahlendosen (Bundesamt für Strahlenschutz 2012, Sousa et al. 2010), da die Anzahl der Doppelstrangbrüche direkt abhängig von der Höhe der verwendeten Strahlendosis (Löbrich 2005, Geisel 2008) ist. Dies kann man natürlich vor allem zurückführen auf technische Neuerungen wie zum Beispiel der vor einigen Jahren eingeführte mehrzeilige Computertomograph und die dadurch resultierende Verkürzung der Untersuchungs- und Bestrahlungszeiten.

Die Reduktion der Strahlendosis ist auch weiterhin Gegenstand aktueller Forschung, wie zum Beispiel im Rahmen sogenannter minimal-dose Protokolle (Christe 2013),

welche dazu führen wird, dass die Schädigung der DNA während Computertomographien in Zukunft eine immer kleinere Rolle spielt.

Es zeigte sich in der vorliegenden Studie auch kein signifikanter Unterschied zwischen nativ bestrahlten und nach KM-Gabe bestrahlten Patienten. Im Durchschnitt wiesen Patienten der Gruppe "nativ" nach der CT-Untersuchung 0,171 Foci pro Zelle auf. Patienten der Gruppe "mit KM" wiesen im Schnitt 0,192 Foci pro Zelle auf, was einem Zuwachs der Foci-Zahl um ca. 11% entspricht. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war allerdings statistisch nicht signifikant ( $p= 0,554$ ), was sich mit den Ergebnissen von Grudzenski et al. (2009) und Pathe et al. (2011) deckt, wobei bei Pathe et al. die Gruppe mit KM ca. 30% mehr Doppelstrangbrüche aufwies als die native Gruppe. Bei den in vitro Ergebnissen von Grudzenski et al. (2009) und auch Deinzer et al. (2013) hatte sich ein Effekt von iodhaltigen Kontrastmitteln auf die Anzahl der entstehenden Doppelstrangbrüche gezeigt. Dieser konnte allerdings in keiner der Studien auf die in vivo Daten übertragen werden.

### **5.3.2 Diskussion des Einflusses der Störfaktoren auf die Foci-Zahl**

Um möglichst repräsentative Aussagen treffen zu können, wurde zur Untersuchung der Störfaktoren die Gruppe "mit KM" näher untersucht und in Subgruppen unterteilt. In der Gruppe "nativ" wären Gruppengrößen mit  $n < 5$  entstanden, in welchen einzelne Ausreißer ein zu großes Gewicht entwickelt hätten. Im Folgenden beziehen sich die Angaben auf die am jeweiligen DLP normierten Foci pro Zelle.

#### **5.3.2.1 Einfluss des Alters**

Der Fakt, dass viele unterschiedliche Arten von Tumoren im Alter mit einer höheren Wahrscheinlichkeit auftreten (Kehinde et al. 2006, Lokate et al. 2013, Bordonaro und Lazarova 2014), legte es uns nahe, den Einfluss des Alters näher zu untersuchen. Eine

mögliche Begründung dieses Phänomens sind die im Laufe des Alterungsprozesses gestörten oder nicht mehr richtig funktionierenden DNA-Reparaturmechanismen. Dies wurde in Studien an Tieren bereits untersucht und passt von der Tendenz her auch zu unseren Ergebnissen (Kovalchuk et al. 2014).

Wir teilten zur Untersuchung des Faktors Alter die Patientengruppe "mit KM" in die vier bedeutendsten Subgruppen 40-49-jährige, 50-59-jährige, 60-69-jährige, 70-79-jährige und vernachlässigten die geringere Anzahl der Patienten der übrigen Altersklassen.

Auffällig war zunächst der Anstieg der Foci-Werte linear mit steigendem Alter. Interessanterweise bezog sich der Anstieg der Foci-Zahl auf die Werte sowohl vor als auch nach der CT-Untersuchung. Das Hintergrundfocuslevel der jüngsten Altersklasse war signifikant geringer als das aller anderen Altersklassen ( $p=0,0092$ ). Das mit dem Alter steigende Hintergrundfocuslevel lässt sich dabei gut mit den im Alter zunehmenden DNA-Schäden und Apoptose-Vorgängen erklären (Kovalchuk 2014), welche dann in der Folge entsprechend Ursache der höheren Tumorraten sein können (Kehinde 2006, Lokate 2013, Bordonaro 2014).

Ein weiterer interessantes Ergebnis unserer Studie war auch, dass sich der Anstieg der Foci-Zahlen nach CT im Vergleich zum Hintergrundfocuslevel zwischen den Altersgruppen nicht wesentlich unterschied. Die Foci pro Zelle stiegen in der Gruppe der 70-79-jährigen durchschnittlich nur um 1,57%, welches der geringste Anstieg in allen Gruppen darstellte. Am stärksten stiegen die Werte in der Gruppe der 60-69-jährigen mit durchschnittlich 10,28%. Dies überraschte deshalb, weil der Erwartung nach die Doppelstrangbrüche mit steigendem Alter schlechter repariert werden sollten. Ein Erklärungsansatz hierfür wäre eventuell der Zeitpunkt der Blutabnahme und der Fakt, dass wir nach der CT nur eine Blutabnahme durchführten. In der vorliegenden Arbeit gab es somit keine zeitliche Disseminationskomponente und deshalb in Hinblick auf den Verlauf des Reparaturprozesses keine Datenerhebung. Es wäre es durchaus denkbar, dass sich die Unterschiede zwischen den Altersgruppen erst zu späteren Zeitpunkten manifestierten und somit durch unser Studiendesign nicht zu erfassen waren. Diese These zu überprüfen wäre eine Aufgabe für zukünftige Studien zu dieser Thematik. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Alter zwar einen Effekt auf die absolute Zahl der gemessenen Doppelstrangbrüche

hat, jedoch bei der Neuentstehung durch diagnostische Röntgenstrahlung, innerhalb der ersten Minuten zumindest, nur eine untergeordnete Rolle spielt.

### 5.3.2.2 Einfluss des BMI

Der BMI hat definitiv einen Einfluss auf die CT-Untersuchung. Das zeigt allein die Tatsache, dass die Röhrenspannung im Rahmen unserer Studie BMI-abhängig verändert wurde. Patienten mit einem BMI  $< 25,0 \text{ kg/m}^2$  erhielten eine Röhrenspannung von 120 kV, während bei Patienten mit einem BMI  $\geq 25,0 \text{ kg/m}^2$  eine Spannung von 140 kV angelegt wurde, um Bilder derselben Qualität zu erhalten. Patienten mit höherem BMI erhalten im Schnitt bei auf Röntgenstrahlung basierenden Untersuchungen viel höhere Energiedosen als Normalgewichtige, was durch mehrere Arbeiten belegt ist (Rampado et al. 2008, Ashish et al. 2014). Interessant war deswegen für uns die Auswirkung auf die Anzahl der Doppelstrangbrüche abhängig vom BMI und der damit verbundenen höheren Dosis. Für die Untersuchung des Faktors BMI teilten wir die Gruppe "mit KM" in drei Subgruppen gemäß der BMI-Klassifikation ein: Untergewichtige (BMI  $< 18,5 \text{ kg/m}^2$ , Gruppe 1), Normalgewichtige (BMI  $18,5\text{-}24,9 \text{ kg/m}^2$ , Gruppe 2) und Übergewichtige (BMI  $> 24,9 \text{ kg/m}^2$ , Gruppe 3) und verglichen anschließend die Ergebnisse der Gruppen miteinander.

Zunächst beobachteten wir wie erwartet signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf die angewendeten Dosislängenprodukte. So erhielt Gruppe 2 mit  $21,06 \pm 8,16 \text{ mGy*cm}$  das 1,7-fache und die Gruppe 3 mit  $36,12 \pm 11,90 \text{ mGy*cm}$  sogar etwa das 3-fache DLP im Vergleich zu Gruppe 1, welche im Schnitt nur  $12,08 \pm 6,42 \text{ mGy*cm}$  erhalten hatte. Diese große Steigerung im Dosislängenprodukt ließ bei adipösen Patienten höhere Foci-Zahlen vermuten, da die Anzahl der Doppelstrangbrüche eigentlich linear mit steigender Dosis zunimmt (Löbrich 2005, Geisel 2008). Allerdings ließ sich dies durch unsere Ergebnisse nicht bestätigen. In der Gruppe mit den untergewichtigen Patienten stieg die Anzahl der Doppelstrangbrüche nach der CT-Untersuchung um etwa 88% und verdoppelte sich

damit fast. In Gruppe 2 stieg die Zahl der Strangbrüche lediglich um ca. 4,5%, in Gruppe 3 immerhin um ca. 15,3%. Somit erwiesen sich die Gruppen mit den höheren BMIs stabiler gegenüber der Strahlung zumindest in Bezug auf die Doppelstrangbrüche in Lymphozyten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der größere Körperumfang und die vermehrte Energieabsorption in den dickeren Fett- und Bindegewebsschichten bei adipösen Patienten (Schneebauer 2014). Hierdurch würde dann weniger Strahlendosis die Lymphozyten erreichen, die in großer Zahl in den größeren, tiefer liegenden Blut- und Lymphgefäßen anzutreffen sind. Interessant wäre in diesem Zusammenhang der Vergleich der DNA-Schäden in Zellen der Haut oder anderen oberflächlichen Körpergeweben zwischen den Gruppen. Hier könnten Patienten mit hohem BMI und der damit verbundenen höheren Strahlendosis mehr DNA-Schäden aufweisen. Im Rahmen zukünftiger Studien sollte diese These weiter abgeklärt werden.

Eine weitere Auffälligkeit waren die signifikant geringeren Foci pro Zelle in der Gruppe 3 verglichen mit den anderen Gruppen. Dies galt sowohl für das Hintergrundfocuslevel als auch für die Werte nach der CT-Untersuchung. Das Hintergrundfocuslevel war bei untergewichtigen Patienten 2,6-fach höher als das der übergewichtigen Gruppe. Zumindest was die Lymphozyten-DNA betrifft, scheint sich Untergewicht eher schädlich und Übergewicht eher protektiv auf die Schäden auszuwirken. Die genauen Hintergründe auf pathophysiologischer Ebene zu diskutieren, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Ein möglicher Erklärungsansatz zumindest aber wäre der oxidative Stress, dem die Zell-DNA in der Hungersituation ausgesetzt ist, zum Beispiel im Rahmen einer Anorexia nervosa. Dieses Phänomen ist schon seit längerer Zeit Gegenstand der Forschung (Chinnery und Turnbull 1998, Victor et al. 2014) und lässt sich auch mit unseren Ergebnissen vereinbaren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der BMI trotz Anpassung der Röhrenspannung einen Einfluss auf die Anzahl der Doppelstrangbrüche hat und dies bei zukünftigen Arbeiten bei Betrachtung des Patientenkollektivs immer mitberücksichtigt werden sollte.

### 5.3.2.3 Einfluss des Raucherstatus

Rauchen hat einen schädigenden Einfluss auf die DNA, dies ist ein lange bekannter Fakt und wurde in sehr vielen Studien untersucht und belegt (u.a. Danoy et al. 2008, Thavanati et al. 2008, Weng et al. 2009, Kocyigit 2011). Deswegen war es für uns interessant zu untersuchen, inwiefern sich der Raucherstatus auf die Anzahl der entstehenden  $\gamma$ H2AX-Foci auswirkt und somit Einfluss auf das Ergebnis nehmen kann.

Hierzu teilten wir die Gruppe "mit KM" in zwei Subgruppen ein, "Raucher" und "Nichtraucher". Die Gruppe "Raucher" beinhaltet dabei sowohl ehemalige als auch aktive Raucher, unabhängig von der Menge der Zigarettenkonsums. Grund hierfür war das sehr heterogene Rauchverhalten unter den Rauchern und die unscharfen Angaben über die genaue Menge des Konsums. Es war sehr schwierig die Anzahl der sogenannten "pack-years" (Anzahl der Jahre, in denen ein Raucher eine Schachtel pro Tag raucht), welche gerne zur Vergleichbarkeit des Rauchverhaltens herangezogen werden, zuverlässig zu erheben. Auch unter den ehemaligen Rauchern gab es große interindividuelle Unterschiede im Zigarettenkonsum und weiterhin auch sehr verschiedene Abstände zum Zeitpunkt der Beendigung des Rauchverhaltens. All diesen Unterschieden Rechnung zu tragen, erwies sich als sehr schwierig. Vor allem aufgrund der Unschärfe der Angaben und der schwierigen Erhebung der "pack-years" entschieden wir uns letztendlich zu der vereinfachten Einteilung in "Raucher" und "Nichtraucher".

Das durchschnittliche Dosislängenprodukt der Raucher betrug  $28,75 \pm 12,78$  cGy\*cm, das der Nichtraucher  $30,75 \pm 13,17$  cGy\*cm, ein statistisch signifikanter Unterschied konnte hier ausgeschlossen werden ( $p= 0,306$ ).

In den Ergebnissen unserer Auswertung zeigte sich zunächst, dass sich die Hintergrundfocuslevels beider Gruppen nicht signifikant voneinander unterschieden ( $p= 0,827$ ). Dies war vorher nicht zu erwarten, da die Zell-DNA der Raucher eigentlich einer ständigen Schädigung durch oxidativen Stress unterliegt (Thavanati 2008). Man würde folglich ein sehr hohes Hintergrundfocuslevel bei den Rauchern erwarten.

Dennoch gibt es nun mehrere Erklärungsansätze für unser Ergebnis.

Zum einen war unsere Rauchergruppe mit ehemaligen Rauchern, Gelegenheitsrauchern, schwachen und starken Rauchern sehr heterogen zusammengesetzt. So können die teilweise seit Jahrzehnten nicht mehr aktiven Raucher den Durchschnitt der Doppelstrangbrüche senken, weil sie vom Status der zellulären Noxen und der DNA-Schädigung her vielleicht eher Nichtrauchern entsprechen. Hier gilt es in zukünftigen Arbeiten eine klare Regel zu finden und eindeutig zu definieren, ab wann ein Patient in die Gruppe der Raucher gehört. In einem zweiten Schritt könnte man dann eventuell weiterzugehen und die genaue Menge, bei der sich der Zigarettenkonsum schädigend auf die DNA auswirkt, bestimmen.

Zum anderen sind andere Zellarten eventuell stärker von der Schädigung durch Rauchen betroffen als die von uns untersuchten Lymphozyten. So zeigen verschiedene neuere Studien DNA-Schädigungen zum Beispiel in Plazentagewebe (Slatter et al. 2014), Lungengewebe (Ueno et al. 2011) oder auch Schädigung im Nervengewebe (Nasto et al. 2014), welche assoziiert sind mit Inhalation von Zigarettenrauch. Nichtsdestotrotz gab es in der Vergangenheit durchaus auch Studien, welche den schädigenden Effekt des Zigarettenrauchs auch in Lymphozyten messen konnten, wie zum Beispiel bei Zalata et al. (2007), in diesem Fall allerdings mittels COMET-Assay ausgewertet. Diese Ergebnisse konnten wir mit der Immunfluoreszenzmikroskopie nicht nachvollziehen.

Ein weiterer Befund war der stärkere Anstieg der Foci-Zahlen nach der CT-Untersuchung in der Rauchergruppe. Die Doppelstrangbrüche stiegen hier durchschnittlich um 0,00074 Foci pro Zelle an. Dies entsprach fast dem Doppelten der Nichtrauchergruppe, hier stiegen die Foci im Schnitt um 0,00039 pro Zelle. Dieser Effekt war zwar messbar, jedoch statistisch nicht signifikant ( $p= 0,719$ ). Es muss dabei beachtet werden, dass die zahlenmäßigen Unterschiede zwischen den Gruppen sehr klein waren. Es konnte demnach kein sich verstärkender Effekt zwischen Zigarettenkonsum und diagnostischer Bestrahlung nachgewiesen werden. Allerdings gilt dasselbe Problem wie schon beim Hintergrundfocuslevel, die Gruppe der Raucher war nicht scharf definiert, wodurch das Ergebnis nicht einfach auf alle Raucher übertragbar ist. Der Zusammenhang zwischen Zigarettenrauch und diagnostischer Bestrahlung sollte in zukünftigen Studien zunächst in vitro untersucht

und die Ergebnisse dann in vivo in einer Gruppe von Rauchern mit genau bekanntem Zigarettenkonsum überprüft werden.

Es wäre wichtig in dieser Gruppe die DNA-Doppelstrangbrüche mittels der H2AX-Foci darzustellen, um sie genauer untersuchen zu können. Interessant wäre es zum Beispiel auch in Zukunft herauszuarbeiten, ob Unterschiede in den DNA-Reparaturvorgängen zwischen Rauchern und Nichtrauchern bestehen, also mehrere Blutabnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchzuführen und dann die Zunahme bzw. Abnahme der Doppelstrangbrüche zu messen, wie bei Pathe et al. (2011) durchgeführt. So könnten im nächsten Schritt dann DNA-Reparaturenzymdefekte aufgrund von Zigarettenkonsum aufgedeckt werden. Eventuell liegt hier auch eine weitere Ursache unserer Ergebnisse. Die DNA-Schäden könnten sich bei Rauchern durch gestörte DNA-Reparaturenzyme erst zu einem späteren Zeitpunkt in vermehrter Zahl manifestieren. Dies konnten wir mittels Blutabnahme zu nur einem Zeitpunkt nach der CT natürlich nicht erfassen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir mit unserer Untersuchungsmethode den schädigenden Einfluss des Zigarettenkonsums nicht richtig herausarbeiten konnten. Zwar war ein Unterschied zwischen den Gruppen zu messen, allerdings war dieser sehr gering und entspricht nicht der Theorie des stark schädigenden Einflusses des Zigarettenrauchs auf die DNA. Dies mag an der Zusammensetzung der Gruppe liegen oder am relativ frühen Zeitpunkt der Blutabnahme, sollte aber in jedem Fall im Rahmen zukünftiger Arbeiten weiter abgeklärt werden.

#### **5.4 Schwächen und Limitationen der Studie**

Obwohl die manuelle bzw. visuelle Auswertung immer noch den aktuellen Goldstandard repräsentiert, ist sie fehlerbehaftet und vom jeweiligen Untersucher abhängig. Es gibt noch keine allgemein gültigen Regeln, nach denen eindeutig entschieden werden kann, ab welcher Größe ein grüner Punkt einen echten Fokus bzw. einen DNA-Doppelstrangbruch darstellt. Dazu kommt das Problem von sehr nahe beieinander liegenden Kernen, die mit dem Auge trotz 630-facher

Vergrößerung manchmal schwer zu trennen sind und als ein Kern verkannt werden. Dieses Phänomen wird als "touching nuclei" bezeichnet (Hernandez et al. 2013) und erschwert die Auswertung ungemein.

Um bei der Auswertung eine Form der Standardisierung zwischen den Untersuchern zu etablieren, wird schon seit einiger Zeit an automatischen Auswerteprogrammen gearbeitet und diese mit der konventionellen Methode verglichen, wobei die automatische Auswertung laut einiger Studien als mindestens gleichwertig angesehen wird (Böcker und Iliakis 2006). Dass es aber auf diesem Gebiet noch Verbesserungspotential gibt, wird durch eine Vielzahl neuer Studien zur automatischen Auswertung belegt (u.a. Hernandez 2013, Willitzki et al. 2013). Über kurz oder lang wird die automatische Auswertung aber so ausgereift sein, dass sie unserer visuelle Methode sowohl im zeitlichen Aspekt als auch in der Genauigkeit übertreffen wird.

Es gilt außerdem immer zu beachten, dass nur die zum Zeitpunkt der Bestrahlung im Bestrahlungsfeld liegenden Lymphozyten bestrahlt werden können und diese sich mit den peripheren Lymphozyten vermischen. Dieses Phänomen wurde bereits in früheren Arbeiten diskutiert (Geisel 2008, Pathe 2001). In Geisel et al. (2008) wurde von einem Verdünnungseffekt gesprochen, welcher das wahre Ergebnis unterschätzen lässt. In Pathe et al. (2011) wurde dagegen auf das hohe Herz-Zeit-Volumen verwiesen, welches dafür sorgt, dass die Mehrheit der Blutzellen in der kurzen Zeit der Untersuchung mit der Strahlung in Kontakt kommen. Fakt ist, dass die Bestrahlungszeit und -intensität im Zuge des technischen Fortschrittes über die letzten Jahre immer weiter abgenommen hat (Bundesamt für Strahlenschutz 2012, Christe 2013) und folglich natürlich auch die Zahl der bestrahlten Lymphozyten immer geringer wurde bzw. auch in Zukunft immer geringer werden wird. Somit wird der Verdünnungseffekt in Zukunft an Bedeutung gewinnen und die Lymphozyten als Untersuchungsmaterial ungeeigneter werden.

Ein weiteres Problem, welches schon in früheren Arbeiten thematisiert wurde, ist die große genetische Heterogenität unter den Patienten. Die Ergebnisse weisen sehr hohe Schwankungen um die Mittelwerte bzw. hohe Standardabweichungen auf, welche Ausdruck dieser großen Spannweite der Foci-Zahlen sind. Dadurch sind verallgemeinernde Aussagen schwierig zu treffen und die Ergebnisse mit Vorsicht zu

interpretieren. Dies macht unsere große Patientenzahl so wichtig, sie kann einzelne Extremwerte eher relativieren als dies bei einer kleinen Zahl von Patienten möglich wäre.

Unsere Studie hat ferner keine zeitliche Komponente. Das bedeutet, dass wir die Blutabnahmen nur zu einem Zeitpunkt durchführten und nun keine Aussage über die Entwicklung der Anzahl der Doppelstrangbrüche treffen können. Es wäre eine Aufgabe für zukünftige Studien, unseren Untersuchungen um diese zeitliche Komponente zu erweitern, um dann die Reparaturprozesse bezogen auf das Alter oder den Raucherstatus nachzuvollziehen und dann innerhalb der jeweiligen Gruppen vergleichen zu können.

Zuletzt besteht noch das Problem mit der Gruppeneinteilung bei der Untersuchung des Raucherstatus. Es sollte hier noch eine schärfere Unterteilung in Subgruppen vorgenommen werden um genauer den Einfluss des Rauchens auf die DNA-Doppelstrangbrüche nachvollziehen zu können. Dafür wäre es aber notwendig den genauen Raucherstatus zum Beispiel mittels der Einheit "pack-years" zu erheben, was uns bei der Mehrzahl der Raucher nicht gelang und die eigentliche Schwierigkeit bei der Untersuchung darstellt. Besonders die ehemaligen Raucher sind schwer einzuordnen, da sie ein sehr heterogenes Rauchverhalten gezeigt und dieses dann auch in verschiedenen Abständen zur Untersuchung beendet hatten. Dadurch wird es erschwert sie eindeutig als Raucher oder Nichtraucher zu klassifizieren und die Ergebnisse auf die gesamte rauchende Population zu übertragen.

## **5.5 Ausblick**

Die vorliegende Studie weist in den Ergebnissen einige Gemeinsamkeiten, aber auch wesentliche Unterschiede zu den vorhergehenden Studien dieser Reihe auf (Lobrich 2005, Geisel 2008, Grudzinski 2009, Pathe 2011). Wie in Pathe et al. (2011) gefordert, verwendeten wir eine größere Patientenzahl und untersuchten die Effekte der diagnostischen Röntgenstrahlung im Zusammenhang weiterer einfach zu erhebender Faktoren wie des Alters, des BMIs und des Raucherstatus. Zunächst kann

man sagen, dass die dabei verwendete Methodik durch die Erfahrung und Ergebnisse der früheren Studien bereits als etabliert und ausgereift betrachtet werden kann. Die  $\gamma$ H2AX-Foci sind ein sensitiver und zuverlässiger Marker für die DNA-Doppelstrangbrüche, dies können wir mit unserer Arbeit bestätigen. Umso mehr überraschte zum einen das im Vergleich zu früheren Ergebnissen hohe Hintergrundfocuslevel und zum anderen der nur sehr geringe Effekt der CT-Strahlung auf die DNA.

Hier gilt es nun unsere Ergebnisse und Folgerungen in zukünftigen Studien zu bestätigen oder auch zu widerlegen. Wichtig hierbei wird es sein, ein objektives Auswerteverfahren, wie zum Beispiel eine Software zum automatischen Auszählen anzuwenden. Diese werden sich im Zuge des technischen Fortschritts in Zukunft immer mehr durchsetzen und die vom Untersucher abhängige visuelle und damit fehlerbehaftete Auswertung ersetzen.

Zu bestätigen ist auch die These der immer weiter abnehmenden Strahlendosen, welche über die nächsten Jahre zu immer geringer werdenden DNA-Schäden durch die Computertomographie führen werden. Die  $\gamma$ H2AX-Foci stellen den zu diesem Zweck geeigneten Marker dar, bei Lobrich et al. (2005) wurden sie sogar schon als "biologisches Dosimeter" bezeichnet.

Außerdem ist laut unserer Studie der Einfluss des Kontrastmittels im Gegensatz zu Pathe et al. (2011) und im Einklang mit Grudzinski et al. (2009) bezüglich unseres frühen Zeitpunktes der Blutabnahme zu vernachlässigen.

Auch die Untersuchung der Störfaktoren brachte einige Erkenntnisse, wirft aber andererseits viele neue Fragen an zukünftige Studien auf.

Nachweisen konnten wir einen Effekt des Alters auf die Anzahl der schon vor CT bestehenden Doppelstrangbrüche, sodass die Altersstruktur der Patientenpopulation in neuen Studien zu diesem Thema berücksichtigt werden sollte. Die Untersuchung kann noch um eine zeitliche Komponente erweitert werden, mit der dann die Aufdeckung von Unterschieden im Reparaturverhalten zwischen alten und jungen Patienten möglich wird. Im nächsten Schritt könnten dann die entsprechenden geschädigten Enzyme identifiziert und dadurch die zunehmende Karzinogenese im Alter besser verstanden werden.

Wir konnten auch einen Einfluss des BMIs auf die Höhe der neu entstehenden Strangbrüche nachweisen, sodass auch dieser in zukünftigen Arbeiten berücksichtigt werden sollte. Dies kann klinisch insbesondere für kachektische Tumorpatienten mit niedrigem BMI von Bedeutung sein, da untergewichtigen Patienten unseren Ergebnissen zufolge durch jedwede unnötige Bestrahlung besonders viel Schaden in Form von Doppelstrangbrüchen zugefügt wird. Hier gibt die vorliegende Arbeit erste Denkanstöße, welche weiter ausgeführt und letztendlich im klinischen Alltag zu einem Umdenken bezüglich der CT-Untersuchungen und zu strengerer Indikationsstellung bei entsprechenden Patienten führen sollten. In solchen Fällen sollte dann der vermehrte Einsatz anderer bildgebender Maßnahmen, wie beispielsweise des MRTs oder der Sonographie, erwogen werden oder zumindest eine entsprechende Dosisanpassung erfolgen.

Bei der Untersuchung des Einflusses des Raucherstatus gibt es für zukünftige Studien noch Verbesserungspotential. Um genau bestimmen zu können, wie schädlich welche Konsummenge ist, sollte hier eine genaue Erhebung der "pack-years" erfolgen. Patienten, die nicht eindeutig einzuordnen sind, sollten aus der Studie ausgeschlossen werden, um hier einer möglichen Verfälschung der Ergebnisse vorzubeugen. So sollte dann erstens der bekannte schädigende Einfluss auf die DNA (u.a. Danoy 2008, Thavanati 2008, Weng 2009, Kocyigit 2011) überhaupt mittels unserer Methode nachweisbar werden. Zweitens werden dann auch verallgemeinernde Aussagen möglich. Nur so werden wir irgendwann in der Lage sein, die genaue und möglichst unschädliche Strahlendosis abgestimmt auf das Rauchverhalten und die somit schon bestehende Schädigung an der DNA zu finden und mit möglichst wenigen Auswirkungen auf das Erbgut anwenden zu können.

Letztendlich ist die Idealvorstellung natürlich die individuelle Dosisfindung für jeden einzelnen Patienten, angepasst an seine Fähigkeit mit der Strahlenexposition umzugehen und seine Fähigkeit auftretende Schäden zu reparieren. Diesem Ziel sind wir mit der vorliegenden Arbeit durch Untersuchung der Faktoren Alter, BMI und Raucherstatus ein kleines Stück näher gekommen, dennoch gibt es noch viel zu tun. Wir konnten zeigen, dass die CT-Strahlung genauso wie das iodhaltige CT-Kontrastmittel weniger Auswirkungen an der DNA zeigt wie noch vor einigen Jahren.

Allerdings gilt es diese Entwicklung in Zukunft weiter zu optimieren. Die  $\gamma$ H2AX-Foci bieten hierfür den optimalen Kontrollmarker.

## Literaturverzeichnis

1. **Bakkenist C.J., Kastan M.B.**, "DNA Damage Activates ATM Through Intermolecular Autophosphorylation and Dimer Dissociation", *Nature* 421, no. 6922 (January 2003): 499–506.
2. **Becker C.**, "Prophylaxis and treatment of side effects due to iodinated contrast media relevant to radiological practice", *ger. Radiologe* 47, no. 9, (September 2007): 768–773.
3. **Bedford J.S., Goodhead D.T.**, "Breakage of Human Interphase Chromosomes by Alpha Particles and X-Rays", *International Journal of Radiation Biology* 55, no. 2 (February 1989): 211–16.
4. **Bekas M., Gajewski A.K., Pachocki K.**, "How Often Are X-Rays Used as Diagnostic Tool by Healthcare Providers in the Mazovian Province of Poland", *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 64, no. 2 (2013): 155–60.
5. **Bekker-Jensen S. et al.**, "Spatial Organization of the Mammalian Genome Surveillance Machinery in Response to DNA Strand Breaks", *The Journal of Cell Biology* 173, no. 2 (April 2006): 195–206.
6. **Böcker W., Iliakis G.**, "Computational Methods for Analysis of Foci: Validation for Radiation-Induced Gamma-H2AX Foci in Human Cells", *Radiation Research* 165, no. 1 (January 2006): 113–24.
7. **Böhm I., Heverhagen J.T., Klose K.J.**, "Classification of Acute and Delayed Contrast Media-Induced Reactions: Proposal of a Three-Step System", *Contrast Media & Molecular Imaging* 7, no. 6 (November 2012): 537–41.
8. **Bordonaro M., Lazarova D.L.**, "Hypothesis: Cell Signalling Influences Age-Related Risk of Colorectal Cancer", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, (November 2014): not available. doi: 10.1111/jcmm.12366. (epub ahead of print)
9. **Bundesamt für Strahlenschutz** "Umweltradioaktivität und Strahlenbelastung im Jahr 2012", Parlamentsbericht 2012
10. **Burma S., Chen B.P.C., Chen D.J.**, "Role of Non-Homologous End Joining (NHEJ) in Maintaining Genomic Integrity", *DNA Repair* 5, no. 9 (September 2006): 1042–48.
11. **Calisir C. et al.**, "Recognition, Assessment, and Treatment of Non-Union After Surgical Fixation of Fractures: Emphasis on 3D CT", *Japanese Journal of Radiology* 30, no. 1 (January 2012): 1–9.

12. **Calsou P. et al.**, "Coordinated Assembly of Ku and P460 Subunits of the DNA-Dependent Protein Kinase on DNA Ends Is Necessary for XRCC4-Ligase IV Recruitment", *Journal of Molecular Biology* 326, no. 1 (February 2003): 93–103.
13. **Chatgililoglu C., O'Neill P.**, "Free Radicals Associated with DNA Damage", *Experimental Gerontology* 36, no. 9 (September 2001): 1459–71.
14. **Chen H.T. et al.**, "Response to RAG-Mediated VDJ Cleavage by NBS1 and Gamma-H2AX", *Science (New York, N.Y.)* 290, no. 5498 (December 2000): 1962–65.
15. **Chinnery P.F., Turnbull D.M.**, "Vomiting, Anorexia, and Mitochondrial DNA Disease", *Lancet* 351, no. 9100 (February 1998): 448.
16. **Choi K.-H. et al.**, "Cancer Risk in Diagnostic Radiation Workers in Korea from 1996-2002", *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10, no. 1 (January 2013): 314–27.
17. **Christe A. et al.**, "Optimal Dose Levels in Screening Chest CT for Unimpaired Detection and Volumetry of Lung Nodules, with and Without Computer Assisted Detection at Minimal Patient Radiation", *PloS One* 8, no. 12 (2013): e82919.
18. **Clement O., Robert P., Cuenod C. A. et al.**, "Functional imaging of tumors using CT and iodinated contrast media of different molecular weights," *Academic radiology* 9, no. 1, (May 2002): 212-4.
19. **Danoy P., Michiels S., Dessen P., Pignat C., Boulet T., Monet M., Bouchardy C., Lathrop M., Sarasin A., Benhamou S.**, "Variants in DNA double-strand break repair and DNA damage-response genes and susceptibility to lung and head and neck cancers", *Int. J. Cancer* 123, no. 2, (July 2008): 457–463.
20. **Davis F. et al.**, "Medical Diagnostic Radiation Exposures and Risk of Gliomas", *Radiation Research* 175, no. 6 (June 2011): 790–96.
21. **Deinzer C.K.W. et al.**, "Influence of Different Iodinated Contrast Media on the Induction of DNA Double-Strand Breaks After in vitro X-Ray Irradiation," *Contrast Media & Molecular Imaging* 9, no. 4 (March 2014): 259–67.
22. **Deckers C.H., Van Tiggelen R.**, "Were X-Rays Produced Before the Discovery by Röntgen?", *JBR-BTR : Organe De La Société Royale Belge De Radiologie (SRBR) = Orgaan Van De Koninklijke Belgische Vereniging Voor Radiologie (KBVR)* 84, no. 5 (2001): 220–22.

23. **Donmez-Altuntas H. et al.**, "Evaluation of Chromosomal Damage, Cytostasis, Cytotoxicity, Oxidative DNA Damage and Their Association with Body-Mass Index in Obese Subjects", *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 771 (September 2014): 30–36.
24. **Fuchs V.R., Sox H.C.**, "Physicians' Views of the Relative Importance of Thirty Medical Innovations", *Health Affairs (Project Hope)* 20, no. 5 (September 2001): 30–42.
25. **Drouet J. et al.**, "DNA-Dependent Protein Kinase and XRCC4-DNA Ligase IV Mobilization in the Cell in Response to DNA Double Strand Breaks", *The Journal of Biological Chemistry* 280, no. 8 (February 25, 2005): 7060–69.
26. **Emminger H., Benz, C.**, "Physikum exakt- Das gesamte Prüfungswissen für die 1. ÄP", 199 Tabellen ; Stuttgart: Thieme, 2005.
27. **Frit P. et al.**, "Alternative End-Joining Pathway(s): Bricolage at DNA Breaks", *DNA Repair* 17 (May 2014): 81–97.
28. **Geisel D. et al.**, "DNA Double-Strand Breaks After Percutaneous Transluminal Angioplasty 1", *Radiology* 248, no. 3 (September 2008): 852–59.
29. **Grudzinski S. et al.**, "Contrast Medium-Enhanced Radiation Damage Caused by CT Examinations", *Radiology* 253, no. 3 (December 2009): 706–14.
30. **Hall E. J., Giaccia A. J.**, "Radiobiology for the radiologist", *Philadelphia: Lippincott Williams und Wilkins*, 2006.
31. **Heemst van D. et al.**, "End-Joining of Blunt DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Fibroblasts Is Precise and Requires DNA-PK and XRCC4", *DNA Repair* 3, no. 1 (January 5, 2004): 43–50.
32. **Helleday T. et al.**, "DNA Double-Strand Break Repair: From Mechanistic Understanding to Cancer Treatment", *DNA Repair* 6, no. 7 (July 1, 2007): 923–35.
33. **Hernández L. et al.**, "Highly Sensitive Automated Method for DNA Damage Assessment: Gamma-H2AX Foci Counting and Cell Cycle Sorting", *International Journal of Molecular Sciences* 14, no. 8 (2013): 15810–26.
34. **Hewitson T.D., Bisucci T., Darby I.A.**, "Histochemical Localization of Apoptosis with in Situ Labeling of Fragmented DNA", *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 326 (2006): 227–34.
35. **Hillenhof A.** "Barmer-GEK-Arztreport: Deutschland ist MRT-Weltmeister", *Deutsches Ärzteblatt* 2011; 108(6): A-241 / B-193 / C-193

(URL: <http://www.aerzteblatt.de/archiv/80838/Barmer-GEK-Arztreport-Deutschland-ist-MRT-Weltmeister>, Stand: 11.02.2011).

36. **Hünerbein, R.**, "Radiologische Verfahren", *Duale Reihe Radiologie* (Stuttgart: Thieme, 3. Aufl., 2011), S. 89-91
37. **Ismail I.H., Wadhra T.I., Hammarsten O.**, "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* 35, no. 5 (2007): e36–e36.
38. **Jackson S.P.**, "Sensing and Repairing DNA Double-Strand Breaks", *Carcinogenesis* 23, no. 5 (May 2002): 687–96.
39. **Kakaroukas A., Jeggo P.A.**, "DNA DSB Repair Pathway Choice: an Orchestrated Handover Mechanism", *The British Journal of Radiology* 87, no. 1035 (March 2014): 20130685.
40. **Kalish G.M., Bhargavan M., Sunshine J.H., Forman H.P.**, "Self-referred whole-body imaging: where are we now?", *Radiology* 233, no. 2 (November 2004): 353-8.
41. **Katayama H, Yamaguchi K, Kozuka T, Takashima T, Seez P, Matsuura K.**, "Adverse reactions to ionic and nonionic contrast media. A report from the Japanese Committee on the Safety of Contrast Media", *Radiology* 175, no. 3 (June 1990): 621–628.
42. **Katzberg R.W., Newhouse J.H.**, "Intravenous Contrast Medium-Induced Nephrotoxicity: Is the Medical Risk Really as Great as We Have Come to Believe?", *Radiology* 256, no. 1 (July 2010): 21–28.
43. **Kehinde E.O. et al.**, "Prostate Cancer Risk: the Significance of Differences in Age Related Changes in Serum Conjugated and Unconjugated Steroid Hormone Concentrations Between Arab and Caucasian Men", *International Urology and Nephrology* 38, no. 1 (2006): 33–44.
44. **Kiefer J., Kiefer I.**, "Allgemeine Radiologie- Strahlenanwendung - Strahlenwirkung - Strahlenschutz", Berlin [u.a.]: Parey, 2003
45. **Kocyigit A. et al.**, "Mononuclear Leukocyte DNA Damage and Oxidative Stress: the Association with Smoking of Hand-Rolled and Filter-Cigarettes", *Mutation Research* 721, no. 2 (April 2011): 136–41.
46. **Kopp A. F., Mortelet K. J., Cho Y. D. et al.**, "Prevalence of acute reactions to iopro- mide: postmarketing surveillance study of 74,717 patients", *Acta radiologica* 49, no.8, (October 2008): 902-11.

47. **Kovalchuk I.P., Golubov A., Koturbash I.V., Kutanzi K., Martin O.A., Kovalchuk O.**, "Age-Dependent Changes in DNA Repair in Radiation-Exposed Mice", *Radiation Research* (2014): epub ahead of print
48. **Kyrylkova K. et al.**, "Detection of Apoptosis by TUNEL Assay", *Methods in Molecular Biology* 887, no. 5 (2012): 41–47.
49. **Lewis S. et al.**, "Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C in the Absence of Advanced Fibrosis or Cirrhosis", *AJR (American Journal of Roentgenology)* 200, no. 6 (June 2013): W610–16.
50. **Löbrich M. et al.**, "DNA Double-Strand Break Induction in Yeast by X-Rays and Alpha-Particles Measured by Pulsed-Field Gel Electrophoresis", *International Journal of Radiation Biology* 64, no. 5 (November 1993): 539–46.
51. **Löbrich M. 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* 102, no. 25 (June 2005): 8984–89.
52. **Lokate M. et al.**, "Age-Related Changes in Mammographic Density and Breast Cancer Risk", *American Journal of Epidemiology* 178, no. 1 (July 2013): 101–9.
53. **Mcllwraith M.J. et al.**, "Human DNA Polymerase Eta Promotes DNA Synthesis From Strand Invasion Intermediates of Homologous Recombination", *Molecular Cell* 20, no. 5 (December 2005): 783–92.
54. **Munro T.R.**, "The Relative Radiosensitivity of the Nucleus and Cytoplasm of Chinese Hamster Fibroblasts", *Radiation Research* 42, no. 3 (June 1970): 451–70.
55. **Namasivayam S. et al.**, "Adverse reactions to intravenous iodinated contrast media: an update", *Current Problems of Diagnostic Radiology* 35, no. 4 (July 2006): 164–169.
56. **Nasto L.A. et al.**, "Investigating the Role of DNA Damage in Tobacco Smoking-Induced Spine Degeneration", *The Spine Journal : Official Journal of the North American Spine Society* 14, no. 3 (March 2014): 416–23.
57. **Neri E. et al.**, "How to Read and Report CTC.," *European Journal of Radiology* 82, no. 8 (August 2013): 1166–70.
58. **Obe G., Johannes C., Schulte-Frohlinde D.**, "DNA Double-Strand Breaks Induced by Sparsely Ionizing Radiation and Endonucleases as Critical Lesions for Cell Death, Chromosomal Aberrations, Mutations and Oncogenic Transformation", *Mutagenesis* 7, no. 1 (January 1992): 3–12.

59. **Ostling O., Johanson K.J.**, "Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123, no. 1 (August 30, 1984): 291–98.
60. **Pardo B., Gómez-González B., Aguilera A.**, "DNA Repair in Mammalian Cells: DNA Double-Strand Break Repair: How to Fix a Broken Relationship", *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, no. 6 (March 2009): 1039–56.
61. **Pathe C. et al.**, "The Presence of Iodinated Contrast Agents Amplifies DNA Radiation Damage in Computed Tomography", *Contrast Media & Molecular Imaging*, no. 6 (December 2011): 507–13.
62. **Paull T.T. et al.**, "A Critical Role for Histone H2AX in Recruitment of Repair Factors to Nuclear Foci After DNA Damage.", *Current Biology : CB* 10, no. 15 (August 2000): 886–95.
63. **Pekçevik Y., Hasbay E., Pekçevik R.**, "Three-Dimensional CT Imaging in Pediatric Calvarial Pathologies", *Diagnostic and Interventional Radiology (Ankara, Turkey)* 19, no. 6 (November 2013): 488–94.
64. **Persson P. B.**, "Editorial: Contrast Medium-Induced Nephropathy", *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 20, no. 1 (February 2005): i1–i1.
65. **Pfeiffer P. et al.**, "Pathways of DNA Double-Strand Break Repair and Their Impact on the Prevention and Formation of Chromosomal Aberrations", *Cytogenetic and Genome Research* 104, no. 1 (2004): 7–13.
66. **Pilch D.R. et al.**, "Characteristics of Gamma-H2AX Foci at DNA Double-Strand Breaks Sites", *Biochemistry and Cell Biology* 81, no. 3 (June 2003): 123–29.
67. **Preston R.J.**, "The LNT Model Is the Best We Can Do--Today", *Journal of Radiological Protection: Official Journal of the Society for Radiological Protection* 23, no. 3 (September 2003): 263–68.
68. **Prokop M.**, "General Principles of MDCT", *European Journal of Radiology* 45, no. 1, (March 2003): 4–10.
69. **Radon J.**, "Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten. Berichte über die Verhandlungen der Königlich Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig", *Mathematisch-Physikalische Klasse* 1917 69 (1917): 262–277.
70. **Rampado O. et al.**, "Radiation Dose Evaluations During Radiological Contrast Studies in Patients with Morbid Obesity", *La Radiologia Medica* 113, no. 8 (December 2008): 1229–40.

71. **Redon C. et al.**, "Histone H2A Variants H2AX and H2AZ", *Current Opinion in Genetics & Development* 12, no. 2 (April 2002): 162–69.
72. **Reiser M., Kuhn F.P., Debus J.**, "Duale Reihe Radiologie" (Stuttgart: Thieme, 3.Aufl., 2011)
73. **Riballo E. et al.**, "A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent Upon ATM, Artemis, and Proteins Locating to Gamma-H2AX Foci", *Molecular Cell* 16, no. 5 (December 3, 2004): 715–24.
74. **Röntgen W.C.**, "Ueber eine neue Art von Strahlen" (Vorläufige Mittheilung), Stahel'sche K. Hof- und Universitätsbuch- und Kunsthandlung, Würzburg ca. 1896. Digitale Volltext-Ausgabe in Wikisource (URL: [http://de.wikisource.org/w/index.php?title=Seite:%C3%9Cber\\_eine\\_neue\\_Art\\_von\\_Strahlen\\_01.jpg&oldid=1289709](http://de.wikisource.org/w/index.php?title=Seite:%C3%9Cber_eine_neue_Art_von_Strahlen_01.jpg&oldid=1289709), Version vom 19.10.2010).
75. **Rogakou E.P. et al.**, "DNA Double-Stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139", *The Journal of Biological Chemistry* 273, no. 10 (March 6, 1998): 5858–68.
76. **Rogakou E.P. et al.**, "Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo", *The Journal of Cell Biology* 146, no. 5 (September 1999): 905–16.
77. **Rothkamm K., Löbrich M.**, "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* 100, no. 9 (April 2003): 5057–62.
78. **Rothkamm K. et al.**, "Leukocyte DNA Damage After Multi-Detector Row CT: a Quantitative Biomarker of Low-Level Radiation Exposure", *Radiology* 242, no. 1 (January 2007): 244–51.
79. **Rotter M. et al.**, "Interventional Cardiology in Europe 1999", *European Heart Journal* 24, no. 12 (June 2003): 1164–70.
80. **Schäfer C., Klose, K.-J.**, "Übersicht - Verfahren in der Radiologischen Diagnostik", 2008 (URL: [http://www.k-med.uni-giessen.de/ilias3/Modules/Opsilias/index\\_opsilias.php?action=frameset&ref\\_id=9458&skin=kmed&style=kmed](http://www.k-med.uni-giessen.de/ilias3/Modules/Opsilias/index_opsilias.php?action=frameset&ref_id=9458&skin=kmed&style=kmed), Stand: 11/2014).
81. **Schindera S.T. et al.**, "Effect of Patient Size on Radiation Dose for Abdominal MDCT with Automatic Tube Current Modulation: Phantom Study", *AJR (American Journal of Roentgenology)* 190, no. 2 (February 2008): W100–W105.

82. **Schneebauer C.**, "Bildgebende Verfahren für schwer übergewichtige Patienten" 2014, (Fassung vom 15.08.2012) (URL: <http://www.management-krankenhaus.de/topstories/medizintechnik/bildgebende-verfahren-fuer-schwer-uebergewichtige-patienten?page=1>, Stand: 04.12.2014).
83. **Sedelnikova O.A. et al.**, "Quantitative Detection of (125)IdU-Induced DNA Double-Strand Breaks with Gamma-H2AX Antibody", *Radiation Research* 158, no. 4 (October 2002): 486–92.
84. **Shah A. et al.**, "Radiation Dose During Coronary Angiogram: Relation to Body Mass Index", *Heart, Lung & Circulation* 24, no. 1 (January 2015): 21-5.
85. **Singh N.P. et al.**, "A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells", *Experimental Cell Research* 175, no. 1 (March 1988): 184–91.
86. **Slatter T.L. et al.**, "Smoking During Pregnancy Causes Double-Strand DNA Break Damage to the Placenta", *Human Pathology* 45, no. 1 (January 2014): 17–26.
87. **Smith G.C., Jackson S.P.**, "The DNA-Dependent Protein Kinase", *Genes & Development* 13, no. 8 (April 15, 1999): 916–34.
88. **Soares J.P. et al.**, "Age-Related Increases in Human Lymphocyte DNA Damage: Is There a Role of Aerobic Fitness?", *Cell Biochemistry and Function* 31, no. 8 (December 2013): 743–48.
89. **Sousa P.J. et al.**, "Radiation in Cardiac CT: Predictors of Higher Dose and Its Reduction Over Time", *Revista Portuguesa De Cardiologia : Orgão Oficial Da Sociedade Portuguesa De Cardiologia = Portuguese Journal of Cardiology : an Official Journal of the Portuguese Society of Cardiology* 29, no. 11 (November 2010): 1655–65.
90. **Stiff T. et al.**, "Nbs1 Is Required for ATR-Dependent Phosphorylation Events", *The EMBO Journal* 24, no. 1 (January 2005): 199–208.
91. **Stucki M. et al.**, "MDC1 Directly Binds Phosphorylated Histone H2AX to Regulate Cellular Responses to DNA Double-Strand Breaks", *Cell* 123, no. 7 (December 2005): 1213–26.
92. **Su T.T.**, "Cellular Responses to DNA Damage: One Signal, Multiple Choices", *Annual Review of Genetics* 40, no. 1 (2006): 187–208.
93. **Takahashi A., Ohnishi T.**, "Does gammaH2AX Foci Formation Depend on the Presence of DNA Double Strand Breaks?", *Cancer Letters* 229, no. 2 (November 18, 2005): 171–79.

94. **Tartaglione T. et al.**, "Importance of 3D-CT Imaging in Single-Bullet Cranioencephalic Gunshot Wounds", *La Radiologia Medica* 117, no. 3 (April 2012): 461–70.
95. **Thavanati P.K.R. et al.**, "Age-Related Correlation Between Antioxidant Enzymes and DNA Damage with Smoking and Body Mass Index", *The Journals of Gerontology. Series a, Biological Sciences and Medical Sciences* 63, no. 4 (April 2008): 360–64.
96. **Ueno S. et al.**, "Smoking Induces Bimodal DNA Damage in Mouse Lung", *Toxicological Science: an Official Journal of the Society of Toxicology* 120, no. 2 (April 2011): 322–30.
97. **Uziel T. et al.**, "Requirement of the MRN Complex for ATM Activation by DNA Damage", *The EMBO Journal* 22, no. 20 (October 2003): 5612–21.
98. **Victor V.M. et al.**, "Altered Mitochondrial Function and Oxidative Stress in Leukocytes of Anorexia Nervosa Patients", *PLoS One* 9, no. 9 (2014): e106463.
99. **Wagner, von C. et al.**, "Patient Acceptability of CT Colonography Compared with Double Contrast Barium Enema: Results From a Multicentre Randomised Controlled Trial of Symptomatic Patients", *European Radiology* 21, no. 10 (October 2011): 2046–55.
100. **Walker J.R., Corpina R.A., Goldberg J.**, "Structure of the Ku Heterodimer Bound to DNA and Its Implications for Double-Strand Break Repair", *Nature* 412, no. 6847 (August 2001): 607–14.
101. **Ward I.M. et al.**, "Accumulation of Checkpoint Protein 53BP1 at DNA Breaks Involves Its Binding to Phosphorylated Histone H2AX", *The Journal of Biological Chemistry* 278, no. 22 (May 2003): 19579–82.
102. **Ward J. F., Blakely W.F., Jone E.I.**, "Mammalian Cells Are Not Killed by DNA Single-Strand Breaks Caused by Hydroxyl Radicals From Hydrogen Peroxide", *Radiation Research* 103, no. 3 (September 1985): 383–92.
103. **Ward J.F.**, "The Yield of DNA Double-Strand Breaks Produced Intracellularly by Ionizing Radiation: a Review", *International Journal of Radiation Biology* 57, no. 6 (June 1990): 1141–50.
104. **Weng H. et al.**, "Effects of cigarette smoking, XRCC1 genetic polymorphisms, and age on basal DNA damage in human blood mononuclear cells", *Mutation Research* 679 no. 1-2, (September- October 2009): 59–64.
105. **West S.C.**, "Cross-Links Between Fanconi Anaemia and BRCA2", *DNA Repair* 2, no. 2 (February 2003): 231–34.

106. **Willitzki A., Lorenz S., Hiemann R., Guttek K., Gohl A., Hartig R. et al.**, "Fully automated analysis of chemically induced  $\gamma$ H2AX foci in human peripheral blood mononuclear cells by indirect immunofluorescence", *Cytometry. Part a: the Journal of the International Society for Analytical Cytology* 83, no. 11, (November 2013): 1017–1026.
107. **Yang C.-W. et al.**, "Are There Useful CT Features to Differentiate Renal Cell Carcinoma From Lipid-Poor Renal Angiomyolipoma?", *AJR (American Journal of Roentgenology)* 201, no. 5 (November 2013): 1017–28.
108. **Yano K., Morotomi-Yano K., Akiyama H.**, "Cernunnos/XLF: a New Player in DNA Double-Strand Break Repair", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, no. 6 (June 2009): 1237–40.
109. **Zalata A. et al.**, "Increased DNA damage in children caused by passive smoking as assessed by comet assay and oxidative stress", *Mutation Research* 629, no. 2 (May 2007): 140–147.
110. **Zhang Y. et al.**, "Partial Deficiency of DNA-PKcs Increases Ionizing Radiation-Induced Mutagenesis and Telomere Instability in Human Cells" *Cancer Letters* 250, no. 1 (May 18, 2007): 63–73.
111. **Zöllner F.**, "Physikalische Grundlagen der Röntgentechnik und Sonographie-Eigenschaften von Röntgenstrahlen", Universität Heidelberg, (URL: [http://www.umm.uni-heidelberg.de/inst/cbtm/ckm/lehre/physikalischegrundlagenderroentgen/physikl\\_grundl\\_roentgen\\_3.pdf](http://www.umm.uni-heidelberg.de/inst/cbtm/ckm/lehre/physikalischegrundlagenderroentgen/physikl_grundl_roentgen_3.pdf), Stand: 27.04.2010).

## Abkürzungsverzeichnis

ATM	Proteinkinase ataxia teleangiectasia mutated
BRCT-Domäne	BRCA1 carboxyl terminal-Domäne
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
CTs	Computertomographien
CTDI <sub>vol</sub>	Volumenbezogener CT-Dosisindex
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DLP	Dosislängenprodukt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-Proteinkinase
DSB	Doppelstrangbruch
DSBs	Doppelstrangbrüche
ESBs	Einzelstrangbruch
et al.	et alia (und andere)
e.g.	exempli gratia (zum Beispiel)
FCS	Fetal Calf Serum

g	Beschleunigung
Gy	Gray
h	Stunde
HE	Hounsfieldeinheit
HR	Homologe Rekombination
IR	Ionizing Radiation, ionisierende Strahlung
KM	Kontrastmittel (singular)
KMs	Kontrastmittel (plural)
kV	Kilovolt
LMDS	Locally Multiply Damaged Sites
LNT-Modell	Linear No-threshold-Modell
m	männlich
mg	Milligramm
mGy	Milligray
min	Minuten, minutes
ml	Milliliter
MRN-Komplex	Heterotrimerer Proteinkomplex
mSv	Millisievert
n	Anzahl

NHEJ	Nichthomologes Endjoining
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PCC	Premature Chromosome Condensation, vorzeitige Chromosomenkondensation
s	Sekunden
Sv	Sievert
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling
u.a.	unter anderem
V	Volt
w	weiblich
w <sub>R</sub>	Strahlenwichtungsfaktor
Z	Ordnungszahl
α	alpha
γ	gamma
η	eta

## Zusammenfassung

Da röntgenbasierte Untersuchungen über die letzten Jahre und Jahrzehnte im klinischen Alltag weltweit erheblich an Bedeutung gewonnen haben, ist es von immenser Wichtigkeit die Neben- und Auswirkungen zu kennen und richtig einordnen zu können. Neben anderen Kontrastmittelnebenwirkungen wie zum Beispiel Unverträglichkeitsreaktionen stehen hierbei Schäden an der DNA durch die Röntgenstrahlung im Vordergrund. Mehrere Arbeiten zu diesem Thema haben in der Vergangenheit gezeigt, dass Kontrastmittel-gestützte CT-Untersuchungen eine schädigende Wirkung auf die DNA haben. Unsere Arbeit sollte diese Ergebnisse anhand eines größeren Patientenkollektivs und vor dem Hintergrund der immer geringer werdenden angewandten Strahlendosis kritisch überprüfen. Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Einfluss weiterer Störfaktoren auf das Ergebnis überprüft werden. Wir untersuchten den Einfluss des Alters, des BMI und den des Raucherstatus, da diese im klinischen Alltag schnell zu erhebende Variablen darstellen.

Wir wählten die durch viele frühere Arbeiten etablierte Immunfluoreszenzmikroskopie der  $\gamma$ H2AX-Foci als Methode. Diese repräsentieren einen idealen Marker für die DNA-DSBs, welche die schwerwiegendsten Schäden an der DNA sind. Hierfür wurden Lymphozyten von 225 Patienten (53 nativ und 172 mit KM) zuerst vor und dann nach einer indizierten CT-Thorax-Untersuchung gewonnen und anschließend immunhistochemisch gefärbt. Somit konnten die DSBs als grün fluoreszierende Foci unter dem Fluoreszenzmikroskop gesehen und von zwei bezüglich des Zeitpunkts der Probengewinnung verblindeten, unabhängig voneinander arbeitenden und erfahrenen Untersuchern ausgezählt werden.

Es wurden zunächst die Gruppen "mit KM" und "nativ" verglichen.

Für den Einfluss der Störfaktoren wurde die Gruppe "mit KM" näher untersucht. Um den Einfluss des Alters zu bestimmen, wurden die Patienten in die 4 bedeutendsten Altersgruppen unterteilt und diese miteinander verglichen (40-49-jährige, 50-59-jährige, 60-69-jährige, 70-79-jährige). Für den Einfluss des BMI wurde die Gruppe in drei Subgruppen entsprechend der BMI-Klassifikation in Untergewichtige ( $< 18,5 \text{ kg/m}^2$ ), Normalgewichtige ( $18,5- 24,9 \text{ kg/m}^2$ ) und Übergewichtige ( $\geq 25,0 \text{ kg/m}^2$ )

unterteilt und untersucht. Um den Einfluss des Raucherstatus näher zu untersuchen, wurde die Gruppe in "Raucher" und "Nichtraucher" unterteilt, wobei auch alle ehemaligen Raucher zu den Rauchern gezählt wurden.

Beim Vergleich zwischen den Gruppen "mit KM" und "nativ" war kein signifikanter Unterschied messbar ( $p=0,44$ ). Durchschnittlich stieg die Zahl der Foci pro Zelle in der Gruppe "mit KM" um 0,0005 pro Zelle, während sie in der Gruppe "nativ" sogar um 0,00015 sank. Diese Veränderungen waren statistisch nicht signifikant.

Bei der Untersuchung der Störfaktoren zeigte sich, dass die jüngste untersuchte Gruppe signifikant weniger Foci pro Zelle vor CT aufwies als die älteren Gruppen ( $p=0,0092$ ). Nach der CT-Untersuchung war dieser Unterschied knapp nicht mehr statistisch signifikant ( $p=0,0511$ ). In den BMI-Gruppen wies die Gruppe der Übergewichtigen signifikant geringere Foci-Zahlen sowohl vor ( $p=0,0019$ ) als auch nach der CT ( $p=0,0002$ ) verglichen mit den anderen beiden Gruppen auf. Bei der Untersuchung des Raucherstatus zeigte sich zwar ein mit durchschnittlich 0,00074 Foci pro Zelle höherer Zuwachs bei den Rauchern als bei den Nichtrauchern mit 0,00039 zusätzlichen Foci pro Zelle, dieser Unterschied war aber statistisch nicht signifikant ( $p=0,719$ ).

Es muss beachtet werden, dass sehr große Standardabweichungen vorlagen, welche die individuellen Unterschiede zwischen den Patienten widerspiegeln. Desweiteren waren große Unterschiede in den Hintergrundfocuslevels verglichen mit früheren Arbeiten zu beobachten, welche mit unterschiedlicher Definition eines Focus und den Problemen bei der visuellen Auswertung erklärt werden können.

Die Ergebnisse unserer Studie widersprechen teilweise Ergebnissen früherer Studien, vor allem der mangelnde Zuwachs an Foci während der diagnostischen CT-Untersuchung kann aber mit abnehmenden Dosislängenprodukten im Zuge des technischen Fortschrittes erklärt werden. Bei Alter und BMI konnten wir einen Einfluss auf unsere Auswertung nachweisen. Allerdings muss auch beachtet werden, dass wir die Zahl der DSBs nur zu einen Zeitpunkt untersucht haben. In zukünftigen Studien sollte hier eine zeitliche Diskriminierung erfolgen, um den Einfluss noch genauer zu charakterisieren. Außerdem sollte eine sinnvollere Unterteilung der Rauchergruppe gefunden werden, um den schädigenden Einfluss des Rauchens auf die DNA immunfluoreszenzmikroskopisch nachweisen zu können.

## Summary

The number and significance of examinations based on X-rays has become overwhelming in clinical day work. It is therefore of major importance to first of all know all possible side effects and secondly to evaluate them carefully and correctly. Besides well-known effects such as e.g. allergic reactions to the contrast agent, the DNA damages induced by X-rays are of major significance. In the past some investigations had shown a harmful effect of contrast agent-enhanced CT-examinations on the DNA. The aim of our study was to critically control those results with a larger sample of patients. We also had in mind that the main dose length product in CT-examinations was heavily decreased over the last few years which made an update necessary. Furthermore we wanted to examine the impact of certain disturbance variables on the result of the study. We chose to examine the impact of age, BMI and smoker-status on the DNA impairment, because those variables are easily achievable in clinical day work and had shown an impact on DNA in other investigations.

We used the by many trials well established method of immunofluorescent microscopy of the  $\gamma$ H2AX-foci. These represent the ideal marker for DNA double strand breaks, the most severe damages of DNA. We collected lymphocytes from 225 patients, 53 undergoing a native examination (group 1), 172 receiving contrast agent (group 2), before and after their medically indicated CT-scan of the thorax. The samples were then immunostained and examined under the immunofluorescent microscope. The DNA-DSBs now could be detected as green foci and two experienced, independent and regarding to the time of sample achievement blinded examiners could analyze the samples. In a first step group 1 and group 2 were compared, secondly we took a closer look at the possible confounders age, BMI and smoker-status among the group 2. For this matter we divided the group into four big age groups (40-49 year-olds, 50-59 year-olds, 60-69 year-olds, 70-79 year-olds) and compared those. To examine the impact of BMI, we divided group 2 in three subgroups according to the BMI-classification in underweight ( $< 18.5 \text{ kg/m}^2$ ),

normalweight (18.5-24.9 kg/m<sup>2</sup>) and overweight ( $\geq 25.0$  kg/m<sup>2</sup>) patients. To examine the impact of smoking we again divided group 2, this time comparing smokers to non-smokers, whereas all the patients which used to smoke in the past were assigned to the smokers group.

Comparing group 1 to group 2 there was no statistically significant difference in rise of foci notable ( $p= 0.44$ ). The mean foci achievement in group 2 was 0.0005 foci per cell, group 1 even showed 0.00015 less foci after the examination, both effects showing no statistical significance.

Examining the impact of age on the foci numbers, we found significant less foci per cell among the youngest age group before the CT-scan compared to the other age groups ( $p= 0.0092$ ). After the CT-scan the number was still smaller, but not statistically significant anymore ( $p= 0.0511$ ). In the BMI groups there was a statistical significant difference between the overweight patients and the other weight groups regarding to the foci per cell before ( $p= 0.0019$ ) and after ( $p= 0.0002$ ) the CT-scan. Smokers showed additional 0.00074 foci per cell after the CT-scan, whereas non-smokers had only 0.00039 more foci per cell in mean. This difference was not statistically significant ( $p= 0.719$ ).

One has to take into account the rather high mean deviations, which symbolize the great individual differences in foci numbers among the patients. There were big differences in the backgroundlevels of foci compared to older investigations, which may be explained by different definitions of a focus among the analyzers. Our results partly contradict earlier investigations, this may be due to the decreasing dose length product used in CT-examinations over the last few years. We could show an effect of age and BMI on the evolving number of foci. But you have to take into account that our analysis was restricted to one time point only. In future studies, one could add a few more timepoints to evaluate the development of foci numbers to further investigate the impact of the disturbance variables. Furthermore one should find a sensible subdivision of the smoker-group to be able to point out the effects of smoking on the DNA using immunofluorescent microscopy.

Inhalt entfernt

Inhalt entfernt

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die nachfolgenden Damen und Herren in Marburg, denen mein herzlicher Dank gilt.

Vorklinischer Studienabschnitt:

Aumüller, Braun, Brehm, Cetin, Daut, Decher, del Rey, Feuser, Koolman, Lill, Mueller, Oliver, Preissig-Müller, Rausch, Röhm, Schwarz, Steininger, Thieme, Weihe, Westermann

Klinischer Studienabschnitt:

Apitzsch, Bartsch, Baum, Bien, Czubayko, Donner-Banzhoff, Fuchs-Winkelmann, Geeks, Görg, Gress, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Kann, Kill, Kircher, Klose, Köhler, König, Kolb-Niemann, Kuhlmann, Lohoff, Mahnken, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Neubauer, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Renz, Richter, Ruchholtz, Seifart, Sekundo, Schäfer, Schieffer, Schmidt, Schulze, Sevinc, Sommer, Steinkamp, Stief, Tackenberg, Teymoortash, Vogelmeier, Wagner, Waldmann, Werner

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Johannes T. Heverhagen für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ausführen zu dürfen und für die Unterstützung, auch in den Zeiten, in denen nicht alles nach Plan lief.

Ich bedanke mich bei beiden Direktoren der Abteilung, die zur Zeit der Studiendurchführung im Amt waren, dies waren in chronologischer Folge zuerst Prof. Dr. med. Klaus J. Klose und danach Prof. Dr. med. Andreas H. Mahnken, für die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit in der radiologischen Abteilung der Philipps-Universität Marburg.

Dann bedanke ich mich besonders herzlich bei Frau Beate Kleb, die viel Herzblut, Arbeit und nicht zuletzt Lebenszeit in dieses Projekt investiert hat und mich fortwährend unterstützte.

Ein herzlicher Dank auch an alle mitwirkenden Mitarbeiter der Abteilung für Strahlendiagnostik für die Unterstützung bei Patientenakquisition und -aufklärung, ebenso an alle mitwirkenden Patienten.

Zuletzt gilt mein größter Dank meiner Familie und vor allem meinen Eltern für die Ermöglichung des Medizinstudiums und die Unterstützung in jedweder Hinsicht. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.