Dosis-Wirkungskurve für abteilungsinterne biologische Dosimetrie in der Nuklearmedizin am Anwendungsbeispiel der Radiosynoviorthese

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Binz, Sandra Doris, geb. Kohlhoff

aus Detmold

Gießen 2012

Aus dem Medizinischen Zentrum für Radiologie

Klinik für Nuklearmedizin

der Universität Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. Dr. Richard Bauer

Gutachter: PD Dr. Rigobert Klett

Gutachter: Prof. Dr. Frank Grünwald

Tag der Disputation: 07.05.2013

Dr. med. H. Siecke,

meinen Eltern und meinem Bruder

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Einführung 1
1.2 Ionisierende Strahlung 1
1.3 Chromosomenaberrationen 3
1.4 Biologische Dosimetrie 4
1.5 Periphere Blutlymphozyten 6
1.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung 7
1.7 PAINT-Protokoll 8
1.8 Radiosynoviorthese des Kniegelenkes mit Yttrium-90 11
1.9 Zielsetzung 13

2 Methodik 15
2.1 Biologische Dosimetrie 15
2.1.1 In-vitro-Bestrahlung der Blutlymphozyten 15
2.1.2 Kobalt-60-Dosis-Wirkungskurve 15
2.2 Metaphasenpräparation 16
2.2.1 Blutgewinnung 16
2.2.2 Lymphozytenisolation mittels Dichtegradientenzentrifugation 16
2.2.3 Zellkultur 17
2.2.4 Chromosomenpräparation 17
2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung 18
2.3.1 Verwendete Sonden 18
2.3.2 Durchführung 18
2.4 Quantifizierung der Chromosomenaberrationen 20
2.5 Patientenkollektiv 21
2.6 Radiosynoviorthese 21
2.6.1 RSO-Durchführung 21
2.6.2 Aktivitätsabtransport 22
2.7 statistische Hilfsmittel 24

3 Ergebnisse 25
3.1 Kobalt-60-Dosis-Wirkungskurve 25
3.2 Biologische Dosimetrie am Patientenkollektiv 27
3.3 Aktivitätsabtransport 29

4 Diskussion 31
4.1 Chromosomen 31

4.2 Zytogenetischer Endpunkt 32
4.3 Dosis-Wirkungskurve 35
4.4 Relative biologische Wirksamkeit 37
4.5 Chromosomenaberrationen nach RSO unter Berücksichtigung des Aktivitätsabtransportes 38
4.6 Biologische Dosimetrie 41
4.7 Schlussfolgerungen 47

5 Zusammenfassung 49

6 Summary 52

7 Abkürzungsverzeichnis 55

8 Abbildungsverzeichnis 57

9 Tabellenverzeichnis 58

10 Literaturverzeichnis 59

Ehrenwörtliche Erklärung 67

Danksagung 68

1 Einleitung

1.1 Einführung

Im Bereich der nuklearmedizinischen Diagnostik wird die Strahlenexposition mit einer mittleren effektiven Dosis von 0,13 mSv pro Einwohner im Vergleich zu der Röntgendiagnostik (1,6 mSv 1996, 1,8 mSv 2001) zunächst als eher gering eingestuft. Bei jedoch ca. 3,8 Millionen Radionuklidanwendungen pro Jahr, entsprechend etwa 47 Untersuchungen auf 1000 Einwohner [1], ist das Interesse an der biologischen Dosimetrie im Bereich der Nuklearmedizin groß, denn die Applikation von Radiopharmaka wirft immer wieder Fragen nach einer Strahlenbelastung mit daraus resultierenden zytogenetischen Schäden und nachfolgendem möglichen Tumorrisiko auf.

Mittels biologischer Dosimetrie kann die mutagene Wirkung einer Strahlung auf zellulärer Ebene erfasst werden, wobei das Ausmaß des biologischen Effektes in Abhängigkeit zu der Strahlendosis steht. Die mittels biologischer Dosimetrie durchgeführte Dosisabschätzung nach einer Strahlenexposition dient der Nutzen-Risiko-Abwägung nuklearmedizinischer diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen.

1.2 Ionisierende Strahlung

Die im Rahmen medizinischer Maßnahmen eingesetzten radioaktiven Stoffe und die Röntgenstrahlung sind Quellen ionisierender Strahlung und besitzen genügend Energie, um beim Durchtritt durch Materie entlang ihres Strahlengangs Elektronen aus Atomen herauszulösen und somit elektropositive Ionen entstehen zu lassen, welche ihrerseits durch ihre besondere Reagibilität und Instabilität radiochemische Reaktionen in Gang setzen. Durch die Ionisations- und Anregungsprozesse wird in der bestrahlten Masse innerhalb von 10 bis 18 Sekunden eine Energiedeposition bewirkt [2]. Die, auf die Materie übertragene Energie pro Masseneinheit (J/kg), wird als die Energiedosis Gray (Gy) bezeichnet und ergibt pro Zeiteinheit die Energiedosisleistung (Gy/sec). Die Energie, welche vom Primärstrahl auf das Zielvolumen pro Wegstrecke übertragen wird (keV/µm), ist ein indirektes Maß für die Zahl der Ionisationen pro Wegstrecke und definiert sich durch den linearen Energietransfer (LET). Bei einem LET größer 10 keV/µm wird von dicht ionisierender Strahlung (high-LET Strahlung, Neutronen- und Alphastrahlung), bei einem Wert kleiner 10 keV/µm von dünn ionisierender Strahlung (low-LET Strahlung, Gamma-, Beta- und Röntgenstrahlung) gesprochen. Bei der dicht ionisierenden Strahlung liegt die Abfolge der Ionisationsprozesse dicht beieinander, so auch die resultierenden Schäden, und sie ist daher bei gleicher Energiedosis biologisch wirksamer als die dünn ionisierende Strahlung [3].

Diese unterschiedlichen biologischen Effekte der Strahlungsarten werden durch die relative biologische Wirksamkeit (RBW) ausgedrückt, indem die Energiedosis einer Referenzstrahlung (250 kV Röntgenstrahlung oder Kobalt-60-(^{60}Co-)Gammastrahlung) mit der Energiedosis der Teststrahlung, welche erforderlich ist, um unter sonst gleichen Bedingungen am gleichen biologischen Objekt den gleichen biologischen Effekt zu erzielen wie mit der Energiedosis der Referenzstrahlung, ins Verhältnis gesetzt wird:

$$\text{RBW der Teststrahlung} = \frac{\text{Energiedosis der Referenzstrahlung}}{\text{Energiedosis der Teststrahlung}}$$

[4]. Um im Strahlenschutz diese unterschiedlichen biologischen Risiken von Strahlungen berücksichtigen zu können, wurde zur vereinfachten Handhabung ein Strahlungswichtungsfaktor für jede Strahlungsart eingeführt und beträgt für Beta-, Gamma- und Röntgenstrahlung 1 und für Alphateilchen 20. Somit wird der Alphastrahlung eine 20-fach größere biologische Wirkung zugeschrieben als der Betastrahlung [4]. Während die low-LET Strahlung ihren biologischen Effekt überwiegend durch eine indirekte Strahlenwirkung verursacht, entsteht das biologische Schadensausmaß der high-LET Strahlung häufiger durch eine direkte Strahlenwirkung [4], indem Ionisationsprozesse an Proteinen oder Nukleinsäuren zu einer direkten Bindungsaufbrechung der DNA unter Freisetzung von Energie führen und somit Mutationen oder den Zelltod zur Folge haben. Bei dieser direkten Strahlenwirkung erfolgt die Energieabsorption unmittelbar im biologischen Molekül und die Trefferzahl der ionisierenden Strahlung steigt mit ihrer Dosis [2, 4]. Bei der indirekten Strahlenwirkung hingegen, resultiert aus einem physikalischen Primäreffekt ein chemischer Sekundäreffekt. Da der Körper in einem hohen Prozentsatz aus Wasser besteht (80 %), spielen die radiochemischen Reaktionsprodukte des Wassers hierbei eine besondere Rolle. Durch das Herauslösen eines Bindungselektrons aus einem Wassermolekül (Radiolyse) entstehen freie Radikale und sekundär Peroxyradikale, welche chemische Veränderungen von Molekularstrukturen bedingen können. Es gilt, je höher der Wassergehalt einer Zelle, desto höher ist die Bildung freier Radikale [2, 4]. Unter Gegenwart von Sauerstoff (O_2) kommt es zu weiteren Radikal- und Peroxidbildungen, weshalb die Strahlenwirkung in sauerstoffreichen Geweben verstärkt ist und daraus eine höhere Strahlenempfindlichkeit von Gewebe mit guter Sauerstoffversorgung resultiert (oxygen enhancement ratio) [4].

Über diese Wirkungsmechanismen ionisierender Strahlung besteht im Umgang mit radioaktiven Stoffen im Rahmen eines medizinischen Behandlungskonzepts für den Patienten und für den Anwender bei einer Strahlenexposition die Gefahr deterministische oder stochastische Strahlenschäden zu erleiden. Bei sehr hohen Strahlendosen,

die in kurzer Zeit einwirken, können durch die energiereiche Strahlung so viele Zellen im Gewebe zerstört werden, dass es zu Organschäden wie beispielsweise verbrennungsähnliche Hautschäden, Katarakt der Augenlinse oder Störungen der blutbildenden Zellen kommen kann. Für diese akut auftretenden Schäden sind eine Schwellendosis, unterhalb derer solche Schäden nicht entstehen, und eine Zunahme der Schwere des Effekts mit zunehmender Strahlendosis charakteristisch und werden als deterministischer Effekt bezeichnet. Bleibt die Zelle jedoch lebensfähig, so können stochastische Schäden resultieren, welche nach Exposition kleinerer Dosen auf genetischer oder somatischer Ebene auftreten können. Da zwischen Ursache und Effekt große Zeitintervalle, Jahre bis Jahrzehnte, liegen können, werden sie als Spätschäden bezeichnet und sind dosisabhängig mit einer linear oder linear quadratischen Dosis-Effektbeziehung, ohne dass eine Schwellendosis existiert, ab welcher ein Schaden eintritt [4, 5].

1.3 Chromosomenaberrationen

Als Folge von DNA-Läsionen oder durch Störungen im Ablauf des Zellzyklus können Zellzyklusverzögerungen (mitotic delay) an den so genannten Kontrollpunkten in der G1-, G2-, in der S- und in der Metaphase, an denen der korrekte Ablauf des Zellzyklus kontrolliert und dieser bei erkanntem Schaden bis zu dessen Behebung angehalten wird, auftreten. Das Erkennen und Reparieren der DNA-Schäden erfolgt mittels komplexer Reparaturmechanismen und ist an die Exprimierung von Signaltransduktionssysteme (Cyclin-abhängige Kinasen und ihre Inhibitoren und Tumorsuppressorgene z. B. p53) gebunden. Die genaue Regulation des Zellzyklus ist äußerst wichtig für die genomische Stabilität der Zelle. Ein Misrepair oder eine irreparable Schädigung können zu Aberrationen, einem permanenten Zellzyklusarrest oder zu einer Apoptose führen [3, 6].

Ionisierende Strahlung kann als Synthese-Phase unabhängiges Agens in der G(Gap)0-Phase, der mitotischen Ruhephase, Doppelstrangbrüche an den vorliegenden Ein-Chromatid-Chromosomen auslösen [7], welche sich nach der Replikation als Chromosomentypaberrationen in der Mitose äußern. Zwei wesentliche Reparaturmechanismen, das non-homologous end-joining (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR), sind in der Lage diese Doppelstrangbrüche zu korrigieren. NHEJ kann in der G0- und G1-Phase ohne Übereinstimmung der DNA-Sequenz die Enden der DNA nach erfolgten Doppelstrangbrüchen wieder miteinander verbinden. HR verknüpft in der Synthese- und G2-Phase DNA-Abschnitte mit gleicher oder ähnlicher Nukleotidsequenz wieder miteinander und nutzt hierfür das Schwesterchromatid als Matritze [3]. Ein Misrepair

kann, über Verknüpfung zweier nicht zusammengehöriger Doppelstrangbruchenden, Austauschaberrationen wie beispielsweise dizentrische Chromosomenaberrationen, Insertionen oder Translokationen hervorbringen [7, 8].

Mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) (siehe 1.6) lassen sich die strukturellen Chromosomenaberrationen, welche durch einen oder mehrere Brüche und einer dadurch bedingten interchromosomalen Neuorganisation entstanden sind, erkennen. Diese beinhalten auch die Translokationen, welche zwei Brüche in zwei nicht homologen Chromosomen erfordern. Bei reziproken Translokationen findet ein wechselseitiger Austausch von azentrischen Bruchstücken statt, ohne Verlust von Chromosomensegmenten. Ist der Austausch eines Chromosomensegmentes nur einseitig, so liegt eine nicht reziproke Translokation vor. Die ebenfalls mit FISH darstellbaren Insertionen erfordern mindestens drei Brüche, davon zwei in einem Chromosom, so dass ein Bruchstück herausgeschnitten und in ein anderes Chromosom eingefügt wird. Insertionen und Translokationen gelten als stabile, balancierte Aberrationen, welche die Morphologie der Chromosomen nur geringfügig verändern, so dass die gesamte Erbinformation einschließlich der Aberration auf die Tochterzelle weitergegeben wird. Eine Sonderstellung der Translokationen nimmt die Robertson-Translokation ein, denn durch zentrische Fusion zweier, die langen q-Arme beinhaltender, akrozentrischer Chromosomen kommt es zum Verlust der kurzen p-Arme und einem nachfolgend um eins reduzierten Chromosomensatz. Zu den instabilen Chromosomenaberrationen gehören die dizentrischen Chromosomenaberrationen, welche aus der Fusion zweier Chromosomen unter Verlust von Telomeren resultieren, somit mechanische Probleme bei der Zellteilung bedingen und häufig zum Absterben der Zelle in einer der nachfolgenden Zellteilungen führen.

1.4 Biologische Dosimetrie

In der biologischen Dosimetrie werden mit Hilfe von Eichkurven (Dosis-Wirkungskurven), die durch in-vitro-Experimente gewonnen werden, dosisabhängige Effekte durch Quantifizierung biologischer Indikatoren aufgezeichnet. Über diesen hergestellten Zusammenhang zwischen Strahlenschäden wie Chromosomenaberrationen und der Strahlendosis, kann eine Strahlenbelastung nach Strahlenexposition ermittelt werden und hierüber eine Abschätzung des Strahlenrisikos erfolgen. Über diesen Weg ergänzt die biologische Dosimetrie durch Auswertung körpereigener Indikatoren die physikalische Dosimetrie wie beispielsweise Zähler [9] und findet bei Strahlenunfällen [5, 10, 11], Atombombentests [12], beruflicher Strahlenexposition [5, 13] oder röntgendiagnostischer und nuklearmedizinischer Untersuchungen [1] Anwendung.

Als biologische Indikatoren wurden bisher mittels FISH darstellbare Translokationen, als Bindeglied zwischen der Zytogenetik und der Molekulargenetik, sowie zytogenetische Parameter (mit Giemsa darstellbare dizentrische Chromosomen), zytogenetische Indikatoreffekte (Schwesterchromatid-austausch-(SCA-)Test und Mikronuklei-Test), molekulargenetische Tests (Comet-Test), Tests über das Wachstums- und Vermehrungsverhalten der Zellen (Apoptosemessung, Koloniebildungs-Test) oder über deren Stoffwechselaktivitäten (Succinatdehydrogenase-Aktivitätsmessung) betrachtet. Als Referenzstrahlung werden bei der biologischen Dosimetrie dünn ionisierende Strahlungen wie 250 kV Röntgenstrahlung oder die ^{60}Co-Gammastrahlung eingesetzt [14, 15, 16], obwohl sie bei einem einheitlichen Strahlungswichtungsfaktor von 1, unterschiedliche RBW aufweisen [11, 17].

Die Wahl des richtigen biologischen Indikators, entsprechend dem exponierten Agens, ist entscheidend für die Anwendung der biologischen Dosimetrie [5]. Soll die biologische Dosimetrie nach einer akuten Strahlenexposition ionisierender Strahlung eingesetzt werden, so stehen dizentrische Chromosomen und Mikronuklei im Fokus [5]. Hinsichtlich Mikronuklei ist die quantitative Relation zur Dosis ionisierender Strahlung jedoch weniger gut gesichert und sie nehmen daher einen geringeren Stellenwert ein [5, 18]. Dizentrische Chromosomen unterliegen als instabile Chromosomenaberrationen in vivo einer Reduktion mit der Zeit [15, 19, 20]. Sie fallen pro Mitose um den Faktor 2 bis 4 ab [5, 21] und können somit zu einer Unterschätzung des Strahlenschadens führen [11, 22]. Daraufhin nahmen zur Abschätzung des strahleninduzierten Krebsrisikos, insbesondere in der retrospektiven biologischen Dosimetrie länger zurückliegender Strahlenbelastungen mit größeren Zeitintervallen zwischen Strahlenexposition und Chromosomenanalyse bei chronischen und kumulativen Strahlenexpositionen, mittels FISH darstellbare Translokationen eine Nische in der biologischen Dosimetrie ein [5]. Denn obwohl Translokationen eine interindividuelle Variabilität (Inter-Donor-Variabilität) mit Altersabhängigkeit [23, 24] und eine erhöhte Hintergrundfrequenz aufweisen [16, 25, 26], haben sie, seit 1989 von Lucas et al. die ersten visuellen dosimetrischen Analysen in menschlichen Zellen mit Hilfe von FISH durchgeführt wurden [27], aufgrund ihrer Nachweisbarkeit über die Lebensspanne zunehmend an Bedeutung gewonnen. Als stabile Chromosomenaberrationen bleibt die Zahl der Translokationen auch nach durchlaufenen Mitosen konstant. Mittels der FISH lassen sich Translokationen als ein einfaches Farbmuster darstellen, gut erkennen und somit sicher quantifizieren. Dadurch werden neben der Einarbeitungszeit des Auswerters auch die auswertungsbedingten Fehler minimiert. Aufgrund unterschiedlich angewandter Auswertekrite-

rien und Methodik zwischen den einzelnen Laboren ließen sich bisher noch keine Dosis-Wirkungskurven mit Translokationen als zytogenetische Endpunkte standardisieren [5, 16]. Da die Anwendung fremder Eichkurven zur Ungenauigkeit der Dosisabschätzung führt, sollte jedes Labor seine eigene Eichkurve erstellen [16, 28].

1.5 Periphere Blutlymphozyten

Bereits seit den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts werden strahlungsinduzierte Chromosomenaberrationen in peripheren Blutlymphozyten als biologische Indikatoren untersucht, da sie direkt eine Zellschädigung widerspiegeln [14, 29]. Periphere Blutlymphozyten machen 25 bis 40 % der Leukozyten aus, haben eine Größe von ca. 10 μm und werden beim Erwachsenen auf ca. 500 x 10^9 Zellen geschätzt [5]. Etwa 2 % der gesamten Lymphozyten befinden sich im Blut und tauschen sich überwiegend mit denen in der Lunge, Leber, Milz, im Knochenmark und mit denen in den Lymphknoten befindlichen Lymphozyten aus [5]. Ihre Zirkulationszeit in der Blutbahn beträgt ca. 30 Minuten [5]. Über die Fähigkeit der Migration können die Lymphozyten Organe und Gewebe passieren, die Blutbahn verlassen und über Lymphwege wieder in das Blut rezirkulieren, so dass sich alle Lymphozyten durchschnittlich einmal täglich im Körperkreislauf befinden. Die mit bis zu 3,5 bis 5 Jahren relativ langlebigen peripheren Blutlymphozyten [18] lassen sich aus dem Medium Blut einfach gewinnen und mit unkomplizierten Verfahren für weitere in-vitro-Experimente, im Gegensatz zu anderen Zellen, gut isolieren [15]. Sie sind hoch sensitiv gegenüber ionisierender Strahlung [3, 11], bieten eine weitgehend einheitliche Radiosensitivität [18] und führen nach einer Bestrahlung sowohl in vitro als auch in vivo zu vergleichbaren Aberrationsraten [30]. Daher gelten die peripheren Blutlymphozyten als die wichtigsten Zellen für zytogenetische Analysen nach einer Strahlenexposition [11].

In der fetalen und frühkindlichen Entwicklung entstehen die Vorläuferzellen der Lymphozyten aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Die Differenzierung der Lymphozyten in T- und B-Zellen erfolgt in den primär lymphatischen Organen. T-Lymphozyten bilden mit 80 % den größeren Anteil und erhielten ihre Prägung im Thymus. Sie sind für die zelluläre Immunantwort zuständig und stimulieren über humorale Faktoren wie zum Beispiel Interleukine, die B-Zellen in ihrer Aktivität. Die B-Zellen sind mit nur ca. 20 % der Lymphozyten vertreten, werden im Knochenmark geprägt und übernehmen die humorale Zellantwort in Form einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Später werden die T- und B-Lymphozyten durch klonale Vermehrung von bereits geprägten Lymphozyten vor allem in den Lymphknoten und in der Milz, durch spezifische Antigene getriggert, gebildet und können neben der erworbenen Spezifität auch die

stabilen Chromosomenaberrationen wie Translokationen in die Tochterzellen weitertragen. Die peripheren Blutlymphozyten teilen sich generell jedoch nicht und befinden sich daher als proliferativ inaktive Zellen im Falle einer Strahlenexposition in vivo überwiegend in derselben Zyklusphase, der G0-Phase der Interphase, in welcher die Zellen beliebig lange verweilen können [15, 18]. Um für Analysezwecke periphere Blutlymphozyten in vitro zu einer Zellteilung zu stimulieren, sind Mitogene wie das Phytohämagglutinin (PHA) der Bohnenpflanze Phaseolus vulgaris erforderlich. PHA regt vor allem T-Lymphozyten zur Zellteilung an [5, 31]. Die B-Lymphozyten werden sekundär nach einigen Tagen durch die T-Lymphozyten zur Mitose stimuliert [31]. Dadurch kommen bis zu 96 Stunden nach der Anwendung des Mitogens PHA überwiegend T-Lymphozyten zur Auswertung. Das Mitogen überführt die Lymphozyten über die biosynthetisch aktive G1-Phase in den weiteren Zellzyklus: Nach der Replikation in der Synthese-Phase bestehen die Chromosomen aus zwei im Zentromer zusammengehaltenen Chromatiden mit den erkennbaren kurzen p- und den langen q-Armen. Nach Durchlaufen der G2-Phase treten die Zellen in die Mitose ein. Da die Metaphase der Mitose von den peripheren Blutlymphozyten zu unterschiedlichen Zeiten durchlaufen wird (nicht synchronisierte Zellkulturen), sollen die Zellen in dieser Phase durch die Zugabe eines Spindelgiftes (zum Beispiel Colcemid) in vitro arretiert werden, um für Analysezwecke eine ausreichende Anzahl von Metaphasezellen gewinnen zu können.

1.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Bis zur in-situ-Hybridisierung (ISH) waren die diagnostischen Möglichkeiten der Zytogenetik durch die Auflösung des Lichtmikroskops begrenzt. Die ISH wurde erstmals von den US-amerikanischen Biologen Pardue und Gall 1969 beschrieben [32, 33]. Sie beruht auf der Paarung komplementärer Basen zweier Nukleinsäure-Einzelstränge. Einer davon ist eine bekannte, klonierte DNA-Sequenz, welche gemarkert als Sonde dient, der andere ist die Ziel-DNA, welche im biologischen Präparat vorliegt und nachgewiesen werden soll. Entsprechend ist die Sonden-DNA homolog zu dem untersuchenden Abschnitt der Ziel-DNA. Die Darstellung erfolgt direkt am biologischen Präparat und nicht auf einer Trägermembran [34].

In den Anfängen wurde zunächst mit radioaktiven Sonden gearbeitet, deren Detektion mittels Autoradiographie erfolgte. Die Probleme lagen in den langen autoradiographischen Expositionszeiten, den kurzen Halbwertzeiten einiger Radioisotope und unter anderem in den hohen Anforderungen an den Umwelt- und Arbeitsschutz. Später konnten DNA-Sonden mit nicht radioaktiven Markern (zum Beispiel Biotin, Digoxigenin, Fluoreszenzfarbstoffe) bestückt werden [35, 36]. Nicht radioaktive Sonden lassen sich

längerfristig ohne Aktivitätsverlust aufbewahren, die Detektionszeiten sind kurz und sie bieten eine höhere Auflösung als die radioaktiven Sonden. Erfolgt der DNA-Nachweis über die Detektion von Fluoreszenzen, so spricht man von der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Ihre Anfänge lagen in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts [35, 36], und sie spielt heute eine entscheidende Rolle in diagnostischen Bereichen, bei der Identifizierung von Genen, Verstehen von Pathomechanismen und in der retrospektiven biologischen Dosimetrie.

Fluorochrome lassen sich mittels Fluoreszenzmikroskop durch Bestrahlung mit Licht (Quecksilberdampflampen oder Laser) einer bestimmten Wellenlänge, welche durch einen Anregungsfilter isoliert wird, anregen. Unter Anheben von Elektronen auf ein höheres Energieniveau emittieren die Fluorochrome ihrerseits Licht einer spezifischen Wellenlänge und gelangen anschließend wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Fluorescein FITC hat ein Anregungsmaximum von 495 nm mit einem Emissionsmaximum von 515 nm und fluoresziert grün, hingegen stellt sich Coumarin-AMCA im Anregungsmaximum von 350 nm und mit einem Emissionsmaximum von 450 nm blau dar und Rhodamin zeigt sich bei einer Anregung von 550 nm mit einem Emissionsmaximum von 575 nm rot. Eine Gegenfärbung der nicht markierten Chromosomen kann mit 4`,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) erfolgen, welches sich unter einem Anregungsmaximum von 355 nm beim Emissionsmaximum von 450 nm blau darstellt. Vorteilhaft bei der FISH ist die Möglichkeit der gleichzeitigen Anwendung mehrerer DNA-Proben und Farbstoffe an einer Zelle (Mehrfarben-FISH). Da die DNA-Sonden stabiler als die RNA-Sonden sind, lassen sie sich im Labor einfacher handhaben und werden daher häufiger eingesetzt. Eine optimale Länge für fluoreszierende Sonden umfasst 100 bis 300 Basen, da kürzere Sonden weniger stabile Nukleinsäurepaare bilden und längere mit größer 1 kbp nur erschwert ins Gewebe eindringen können [34]. Seit der Einführung der FISH werden neben den Whole-Chromosome-Paintings, welche Chromosomen in ihrer ganzen Länge markieren, auch Panzentromer- und lokusspezifische Sonden routiniert eingesetzt.

1.7 PAINT-Protokoll

In der Vergangenheit etablierten viele Laboratorien ihre eigene Nomenklatur, um Chromosomenaberrationen zu definieren und zu quantifizieren. Die große Variabilität der Terminologie musste insbesondere für die Vergleichbarkeit in der Forschung vereinheitlicht werden.

Ein bereits bestehendes Protokoll (International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN) bezog sich auf eine Bandenfärbung mit gut darstellbaren Chromosomenstrukturen bei vollständig erkennbarem Karyotyp. Die Besonderheit beim Chromosomen-Painting hingegen, ist eine Teildarstellung des Genoms, welche sich auf die fluoreszierenden Anteile beschränkt. Um eine einheitliche Nomenklatur zur Quantifizierung von Chromosomentypaberrationen unter Anwendung von Whole-Chromosome-Paintings zu schaffen, kam es im Oktober 1993 zu einem Zusammenschluss internationaler Wissenschaftler. Es wurde ein „Protocol for Aberration Identifikation and Nomenclature Terminology“ (PAINT) aufgestellt, um als Guideline für zukünftige experimentelle Arbeiten zu dienen [37]. Auch heute ist es maßgeblich. Das PAINT-Protokoll lässt hinsichtlich des Entstehungsmechanismus oder der Lokalisation der Chromosomenaberration keine Rückschlüsse zu. Es dient lediglich der Beschreibung der Chromosomentypaberrationen verschieden markierter Chromosomen, um eine quantitative Auswertung nach festgelegten Mustern zu ermöglichen. Eine Systematisierung findet nicht statt. Das PAINT-Protokoll bezieht sich nur auf die Aberrationen mit Farbverbindungen, so dass unmarkierte Aberrationen keine Berücksichtigung finden und daher eine Unterschätzung der Anzahl der gesamten Chromosomenaberrationen diskutiert wird [37].

Bei der Anwendung des PAINT-Protokolls [37] ist es erforderlich zunächst die Chromosomenaberrationen ihrer Zugehörigkeit nach zu identifizieren. So wird eine Translokation (t) dann als eine Aberration gewertet, wenn das neu gestaltete Chromosom zweifarbig mit nur einem Centromer ist. Dizentrische Chromosomen (dic) hingegen, weisen zwei Centromere auf und sollten mindestens aus zwei Farben bestehen. Auch einfarbige Dizentrische dürfen mit in die Bewertung eingehen, jedoch nicht ungefärbte Chromosomen. Bei der Erfassung der Centromere kann neben einer adäquaten Hintergrundfärbung ggf. auch eine simultane Hybridisierung mit Centromerproben hilfreich sein. Trizentrische Chromosomen (tri) gehen in die Auswertung mit ein, wenn die benachbarten zentrischen Anteile eine unterschiedliche Farbe haben. Liegen zwei benachbarte, nicht gefärbte, zentrische Stücke aneinander, so entsprechen diese einem nicht gefärbten dizentrischen Chromosom und werden somit nicht berücksichtigt. Analog hierzu werden auch die tetrazentrischen Chromosomenaberrationen (tet) interpretiert. Azentrische Bruchstücke (ace) sollten vollständig oder teilweise gefärbt sein. Ungefärbte, überzählige Bruchstücke werden nicht berücksichtigt. Insertionen (ins) sind azentrische Chromosomenfragmente innerhalb eines anderen Chromosoms. Das azentrische Chromosomenfragment ist somit von einer einheitlichen Farbe eingerahmt.

Ringchromosomen (r), welche stark gebogen sind, müssen, um in die Wertung mit einzugehen, egal ob sie zentrisch oder azentrisch sind, partiell oder vollständig gefärbt sein. Auch hier werden nicht gefärbte Ringe nicht berücksichtigt.

Um komplexere Chromosomenaberrationen erfassen und beschreiben zu können, wurde die Nomenklatur um in Klammern gesetzte Groß- und Kleinbuchstaben, gemäß der Reihenfolge im Alphabet, erweitert. A steht für Anteile nicht gefärbter oder mit einer Hintergrundfarbe gefärbter Chromosomen, B für gemarkerte Chromosomen einer Farbe, C für gemarkerte Chromosomen einer anderen Farbe und so weiter. Die Großbuchstaben werden angewandt, wenn ein Zentromer im Chromosomenanteil der entsprechenden Farbe enthalten ist, die Kleinbuchstaben, wenn kein Zentromer enthalten ist. Beispielhaft beschreibt die Nomenklatur t(Ab) eine Translokation, welche sich aus einem nicht gefärbten zentrischen Chromosom und einem azentrischen, gemarkerten Chromosom zusammensetzt (Abbildung 1.1). Diese Aberration wurde als eins gezählt.

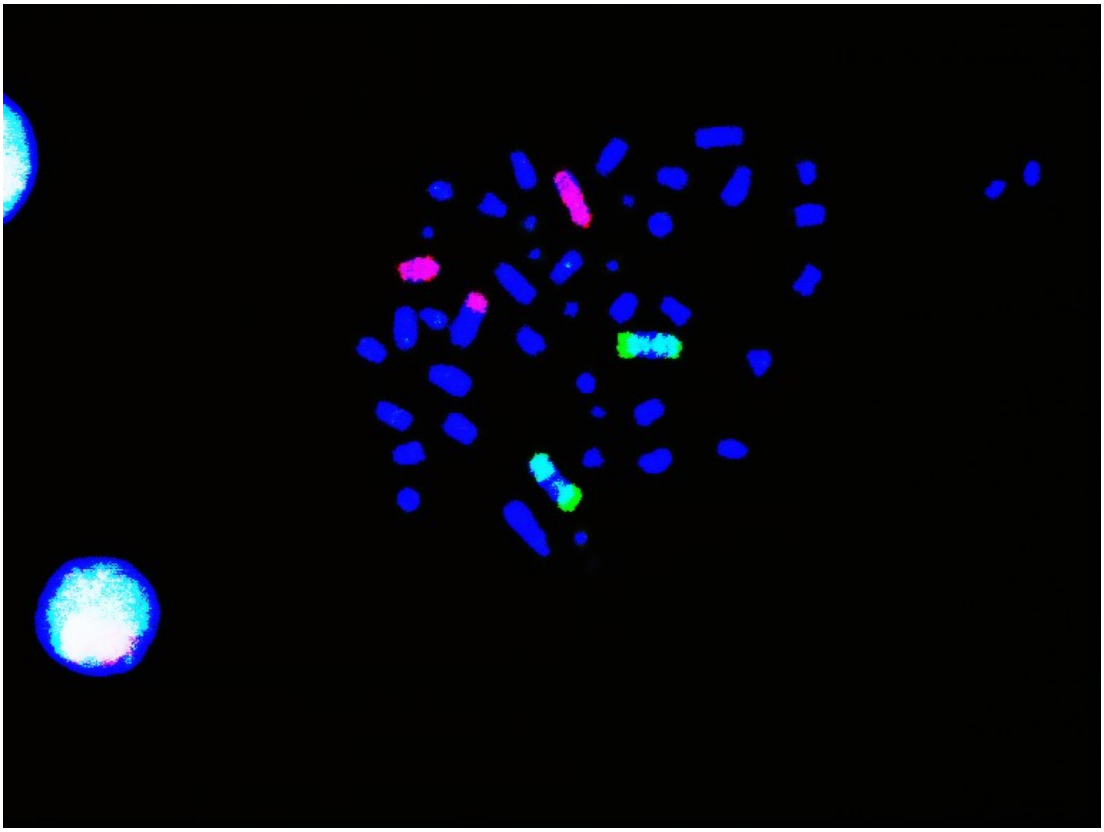

Abbildung 1.1: Nicht reziproke Translokation von Chromosom 2 (rot markiert) mit DAPI gefärbtem unbekannten Chromosom (t(Ab)).

Wenn zwei Translokationen in einem Chromosom enthalten sind, wie beispielsweise bei einem ungefärbten zentrischen Chromosom mit gefärbten azentrischen Chromosomen an dem einen und dem entgegengesetzten Ende (t-t(bAb)), werden sie als zwei

gezählt. Dizentrische aus einem markierten und einem unmarkierten Chromosom (dic(BA)) wurden als eine Aberration gezählt. Die Insertion ins(baB) oder ins(abA) geht als eine Aberration mit in die Wertung ein.

1.8 Radiosynoviorthese des Kniegelenkes mit Yttrium-90

Der Radiosynoviorthese (RSO) kommt aufgrund ihres interdisziplinären Interesses im Bereich Nuklearmedizin, Rheumatologie, Orthopädie und Hämatologie eine besondere Bedeutung zu. Des Weiteren bedarf sie durch einen möglichen lymphogenen Aktivitätsabtransport intraartikulär injizierter Radionuklide und einer dadurch möglichen Strahlenbelastung des Patienten besonderer Aufmerksamkeit. Die erstmals in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts am Menschen durchgeführte RSO [38] leitet sich von den griechischen Wörtern “Synovia“ (Schleimhaut) und “Orthese“ (Wiederherstellung) ab. Mittels intraartikulärer Injektion von Radionukliden erfolgt eine lokale Therapie der Synovialitis mit dem Ziel der Wiederherstellung der Synovia. Dieses Therapieverfahren stellt nach Ausschöpfen der konservativen Maßnahmen (medikamentöse Therapie, Physiotherapie) eine Alternative zur chirurgischen Synovektomie dar. Die Indikation zur RSO wird beispielsweise bei der aktivierten Arthrose als häufigster Gelenkerkrankung mit zunehmender Inzidenz im höheren Lebensalter, bei chronischer Synovialitis, bei symptomatischen Knieendoprothesen oder bei hämophiler Arthropathie, im rheumatischen Formenkreis bei rheumatoider Arthritis, M. Bechterew oder Psoriasisarthritis gestellt [39, 40]. Der Auslöser der Grunderkrankung ist für die Therapie nicht entscheidend, denn Ziel ist es, die Entzündung lokal zu therapieren, den Knorpel zu schützen und dem Patienten den Schmerz zu nehmen. Als Radionuklide haben sich aufgrund ihrer Reichweite bei den großen Gelenken (Kniegelenke) Yttrium-90 (^{90}Y), bei Gelenken mittlerer Größe (Schulter- und Ellenbogengelenke) Rhenium-186 (^{186}Re) und bei den kleinen Gelenken der Finger und Zehen Erbium-169 (^{169}Er) bewährt [40, 41], denn je kleiner das Gelenk ist, desto kürzer sollte die Reichweite des Radionuklids sein, um die Synovialmembran als Zielgewebe zu erreichen, jedoch die Haut und das Knorpelgewebe nicht zu penetrieren [40].

Von den angeführten Radionukliden kommt ^{90}Y hinsichtlich strahlenbiologischer Effekte eine besondere Aufmerksamkeit zu, da aufgrund physikalischer Eigenschaften bei ^{90}Y die größte Strahlenexposition zu erwarten ist und es von den genannten Radionukliden am häufigsten angewandt wird. ^{90}Y zerfällt als Betastrahler bei einer maximalen Betaenergie von 2,279 MeV und einer kurzen Halbwertzeit von 64 Stunden (2,66 Tagen) zu 99 % unter Emission von Betateilchen in stabiles Zirkonium (^{90}Zr) [42]

und weist neben der größten Energie der angeführten Radionuklide bei einer durchschnittlichen Partikelgröße von ca. 10 nm, mit einer mittleren Eindringtiefe von 3,6 mm und einer maximalen Gewebepenetration von 11 mm [42] auch die größte Reichweite auf.

Nach intraartikulärer Injektion des Radionuklids entfaltet es seine Wirkung auf das Synovialgewebe, welches durch entzündliche Veränderungen eine Dickezunahme von 1 auf über 3 mm erfahren kann. Die Produktionsstätte der Synovialflüssigkeit, das Synovialendothel, phagozytiert einen kleinen Teil des Radionuklids und ein weiterer wird an die gefäß- und nervenreiche kollagene Tunica propria weitergeleitet [39]. Dies führt innerhalb weniger Monate, nach anfänglichem Reizerguss durch Strahlensynovitis, zu einer Fibrosierungs- und Sklerosierungsreaktion mit Rückbildung der verdickten Synovialzotten und der Hyperämie, gefolgt von einer verminderten Proliferation des Endothels und einer vollständigen Rückbildung der entzündlichen, zellulären Infiltrate [40, 43]. Eine Granulationsgewebeinduktion wird durch die biologische Abbaubarkeit des verwendeten Radiopharmakons verhindert [40]. Mögliche schwere Komplikationen der RSO wie Strahlennekrosen, intraartikuläre Infektionen oder Thrombosen treten nur selten auf [41, 44].

Das Radionuklid sollte klein genug sein, um die Phagozytose durch das Synovialendothel zu gewährleisten, aber dennoch über eine ausreichende Größe verfügen, um das Gelenk nicht unphagozytiert zu verlassen [42, 43], denn zu dem unerwünschten Weg der Isotope zählt ihr Abtransport aus dem Kniegelenk mit dem Lymphstrom in die regionären inguinalen und nachgeschalteten iliacalen Lymphknoten. Da das lymphatische System mit dem Blutkreislauf auf vielfältige Weise in Verbindung steht, kann es zum Übertritt der Aktivität in die Leber, Milz und in das Knochenmark kommen. Die Wahrscheinlichkeit eines lymphogenen Aktivitätsabtransportes ist durch eine fehlende Immobilisation nach der RSO-Therapie erhöht [45]. Daher wurde eine Ruhigstellung des Gelenkes nach der Therapie für mindestens 48 Stunden gefordert [42]. Ein lymphogener Aktivitätsabtransport aus dem Kniegelenk führt zur Verringerung der im Gelenk angestrebten Strahlendosis und somit zur Verringerung des Therapieeffektes. Zusätzlich wird eine Strahlenbelastung durch den lymphogenen Aktivitätsabtransport der Radionuklide angenommen [22, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51]. Diese mögliche Strahlenexposition kann direkt durch den Nachweis von Chromosomenaberrationen in den Lymphozyten mittels biologischer Dosimetrie bestimmt werden. Der Ursprung der Chromosomenaberrationen der Lymphozyten wird neben einem Übertritt von ^{90}Y aus dem Gelenk in die Lymphknoten auch auf ihr Passieren der Knieregion

zurückgeführt [45, 47]. In früheren Studien wurden die biologischen Effekte nach der RSO, insbesondere in Abhängigkeit des Aktivitätsabtransportes, durch Bestimmung der absoluten Anzahl der Aberrationen nach Durchführung der Maßnahme erfasst. Vernachlässigt wurde hierbei jedoch die Höhe der Strahlenexposition, welche durch die RSO mit ^{90}Y zu den Chromosomenschäden führte.

1.9 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve zur Durchführung einer abteilungsinternen biologischen Dosimetrie in der Nuklearmedizin am Anwendungsbeispiel der RSO des Kniegelenkes mit dem Betastrahler ^{90}Y. Hierbei sollte unter Berücksichtigung langlebiger Chromosomenaberrationen wie Translokationen, die FISH zur Anwendung kommen.

Die Anwendbarkeit der neu erstellten Dosis-Wirkungskurve zur biologischen Dosimetrie soll an 10 Patienten, welche eine RSO erhielten, beispielhaft geprüft werden. Eine Arbeit zur biologischen Dosimetrie mit Translokationen als zytogenetische Endpunkte liegt im Zusammenhang mit der RSO bisher nicht vor. Um einen biologischen Effekt direkt auf die RSO zurückführen zu können, ist die Erfassung der Aberrationen vor und nach der Therapie erforderlich.

Anhand prospektiver Datenerhebung und der neu ermittelten Dosis-Wirkungskurve ist herauszufinden, inwieweit lymphozytäre Chromosomenschäden bei der RSO des Kniegelenkes auftreten und welcher Strahlenexposition diese entsprechen, beziehungsweise welche Strahlenexposition diesen Schäden vorausgegangen ist. In diesem Zusammenhang ist die Frage zu klären, inwieweit sich der ermittelte Dosisbereich des Patientenkollektivs mit dem der Dosis-Wirkungskurve in Deckung bringen lässt.

Berücksichtigung soll auch ein möglicher lymphogener Aktivitätsabtransport des intraartikulär applizierten Radionuklids ^{90}Y finden, denn in früheren Studien wurden mehrfach Chromosomenaberrationen und Strahlungsrisiken im Zusammenhang mit der RSO unter Berücksichtigung des lymphogenen Aktivitätsabtransportes untersucht [22, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51] und die Chromosomenaberrationszunahme nach einem lymphogenen Aktivitätsabtransport kontrovers diskutiert. Daher wird in der vorliegenden Arbeit mittels Gammakamera ein möglicher lymphogener Aktivitätsabtransport des Radionuklids bestimmt und eine eventuelle Chromosomenaberrationszunahme auf Signifikanz geprüft.

Ergänzend zur abteilungsinternen biologischen Dosimetrie in der Nuklearmedizin können die Daten der vorliegenden Arbeit einen weiteren Baustein zur Standardisierung von Dosis-Wirkungskurven mit Translokationen im Sinne der retrospektiven biologischen Dosimetrie lang zurückliegender, chronischer oder kumulativer Strahlenexpositionen liefern.

2 Methodik

2.1 Biologische Dosimetrie

2.1.1 In-vitro-Bestrahlung der Blutlymphozyten

Die peripheren Blutlymphozyten wurden für die in-vitro-Bestrahlung von einem gesunden, 29-jährigen, weiblichen Spender gewonnen, in eine Gewebekulturflasche (25 cm^2, Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhause) in Kultur überführt und bei 37 °C der dünn ionisierenden Referenzstrahlung ^{60}Co-Gammastrahlung (Firma Sulzer, Dosisleistung 0,14 Gy/min) ausgesetzt. Für zehn Dosispunkte mit den Zielwerten zwischen 200 und 1000 mGy wurden, in 100 mGy Intervallen gestaffelt, jeweils 1000 Metaphasen ausgewertet. Das Erreichen der Zielwerte wurde mit einem Teilkörperdosimeter (Forschungszentrum Karlsruhe GmbH) geprüft und nachfolgend gerundet. Die Dosimeterauswertung erfolgte durch das Forschungszentrum Karlsruhe, Mess-Stelle für Festkörperdosimetrie. Anschließend wurden die Proben, einschließlich einer unbestrahlten Kontrollprobe, in gleicher Weise wie auch die Patientenproben inkubiert und aufgearbeitet.

2.1.2 Kobalt-60-Dosis-Wirkungskurve

Zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurve wurde die Zunahme der Chromosomenaberrationen gegen die Dosis in Gy aufgezeichnet. Als Zunahme galt die Differenz der unmittelbar vor und nach der in-vitro-Bestrahlung ermittelten Chromosomenaberrationen. Da für Photonen und Elektronen der selbe Strahlungswichtungsfaktor von 1 angegeben wird, wurde die Chromosomenaberrationszunahme des mit dem Betastrahler ^{90}Y therapierten Patientenkollektivs an der, unter denselben Bedingungen erstellten, ^{60}Co-Dosis-Wirkungskurve gemessen und die Strahlenexposition, welche der Zunahme vorausgegangen war, bestimmt. Die Verteilung der Chromosomenaberrationen in Abhängigkeit von der Dosis der ^{60}Co-Gammastrahlung in Gy wird durch eine linear quadratische Funktion beschrieben:

$$Y = c + \alpha D + \beta D^2$$

mit Y als der biologische Effekt in Chromosomenaberrationen pro Zelle und D als die Dosis in Gy. Die Störgröße c erfasst die Hintergrundfrequenz der Aberrationen in Chromosomenaberrationen pro Zelle und stellt den Schnittpunkt auf der Y-Achse dar. Der Koeffizient α bestimmt die Anfangssteigung, entsprechend den linearen Anteil der linear quadratischen Dosis-Wirkungskurve mit Translokationen pro Zelle pro Gy und ist abhängig von der Strahlungsart und der biologischen Wirkung. Der β-Koeffizient reprä-

sentiert den quadratischen Anteil der Kurvensteigung ebenfalls mit Translokationen pro Zelle pro Gy und ist neben der Strahlungsart auch von der Dosisleistung abhängig.

2.2 Metaphasenpräparation

2.2.1 Blutgewinnung

Eine periphere, venöse Blutentnahme von 20 ml, versetzt mit Heparin im Verhältnis 1:9, fand unmittelbar vor Therapiebeginn und 28 Tage nach der RSO statt. Bei einer Halbwertzeit des ^{90}Y von 64 Stunden, entsprechen 28 Tage 10,5 Halbwertzeiten, nach denen die Strahlendosis gegen null geht, mit dem Ziel, ein Zeitintervall zu erhalten, welches die Erfassung der gesamten Strahlenexposition gewährleistet und gleichzeitig den Zeitraum für mögliche Auswirkungen zusätzlicher Störeinflüsse auf ein Minimum reduziert. Die Ermittlung einer Aberrationsdifferenz lässt individuelle Patientenparameter, wie beispielsweise das Patientenalter, weitere Vorerkrankungen oder spezielle Risikofaktoren der Patienten wie Adipositas, Rauchen oder Therapieverfahren vor der RSO zunächst in den Hintergrund treten.

2.2.2 Lymphozytenisolation mittels Dichtegradientenzentrifugation

Zur Gewinnung einer reinen Lymphozytensuspension aus dem peripheren venösen Blut kam die Dichtegradientenzentrifugation mit einem Lymphozytentrennmedium (Lymphoprep, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norwegen) zur Anwendung. Pro erhaltenes Lymphozytenpellet wurden 3 ml eines Heparin-Blutgemisches im Verhältnis 1:9 mit einer physiologischen, 0,9 %igen Kochsalzlösung im Verhältnis 1:1 verdünnt. Nach Befüllen eines Reagenzglases mit 3 ml Lymphozytentrennmedium wurden 6 ml des Blut-Kochsalzgemisches darauf gegeben und das Reagenzglas verschlossen. Anschließend erfolgte bei Raumtemperatur eine Zentrifugation für 20 Minuten bei ca. 1800 UpM. Um eine Phasenvermischung zu vermeiden, ist die elektrische Bremse der Zentrifuge auszuschalten. Bei einer länger als 2 Stunden zurückliegenden Blutentnahme betrug die Zentrifugationszeit 30 Minuten. Anschließend ließen sich, von oben nach unten betrachtet, vier Phasen erkennen:

- Plasma,
- Lymphozyten als weiße Bande,
- Lymphozytentrennmedium,
- Erythrozyten und Granulozyten.

Nach Absaugen des Plasmas mittels Pasteurpipette konnte anschließend die Lymphozytenbande abpipettiert und in ein weiteres Zentrifugenröhrchen separiert werden, um nach zweimaligen Waschschritten mit physiologischer Kochsalzlösung und anschließender Zentrifugation als möglichst reines Lymphozytenpellet in die Kultur überführt zu werden.

2.2.3 Zellkultur

Die Lymphozyten wurden als Suspensionskulturen angelegt und gezüchtet, da sie zu den nicht adhärenten Zellen gehören und sich im flüssigen Medium ohne Anheftung an das Kulturgefäß vermehren. Als Nährmedium für tierische und menschliche Lymphozyten hat sich das Medium RPMI 1640 (2 g/l $NaHCO_3$, 25 mM HEPES, 5,5 g/l NaCl, 5 mg/l Phenolrot, stabiles Glutamin, Biochemie, Berlin) bewährt. Es wurde um 20 % fetales Kälberserum (FKS, PAA Laboratories, Cölbe) und 1 % Antibiotika (Penicillin/Streptomycin 10.000 Units/10 mg/ml, PAA Laboratories, Cölbe) ergänzt und anschließend im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Kultur wurde in einer Gewebekulturflasche (25 cm^2, Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen) mit 4,5 ml Medium und, um die Teilung der nicht proliferierenden peripheren Blutlymphozyten zu triggern, mit dem Mitogen PHA (Sigma-Aldrich, Seelze) in einer Konzentration von 10 µg/ml angelegt und bei 37 °C inkubiert. Am Ende der 45. Inkubationsstunde, 3 Stunden vor Kulturende, wurde das Spindelgift Colcemid (Sigma-Aldrich, Seelze) in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml hinzugegeben, damit die 23 Chromosomenpaare des diploiden Chromosomensatzes am Ende der Kulturzeit von insgesamt 48 Stunden, in Metaphasezellen kondensiert und damit gut erkennbar für die Chromosomenanalysen zur Verfügung stehen [51].

2.2.4 Chromosomenpräparation

Nach der Inkubation und Colcemidbehandlung der Zellkultur ist eine Trennung der Lymphozyten von dem Medium erforderlich, um anschließend die Tropfpräparate für die Chromosomendarstellung auf einem Objektträger herstellen zu können. Hierfür wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Zunächst erfolgte das Dekantieren der Suspension aus der Zellkulturflasche in ein Zentrifugenröhrchen und nach dessen Verschluss die Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000 UpM.

- Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette bis auf etwa 1 ml entnommen und das im Röhrchen verbleibende Zellsediment mit der Restflüssigkeit ohne Blasenbildung resuspendiert.
- Die Suspension wurde mit 10 ml einer auf 37 °C vorgewärmten hypotonen KCL-Lösung (75 mM) gemischt, 15 Minuten bei 37 °C im vorgeheizten Wasserbad inkubiert und anschließend für 25 Minuten bei 1000 UpM zentrifugiert.
- Erneutes Absaugen des Überstandes und Resuspendieren waren erforderlich, bevor tropfenweise insgesamt 10 ml eines gut gekühlten Fixativs aus 100 % Methanol und Eisessig (konzentrierte Essigsäure) im Verhältnis 3:1 hinzugegeben wurde und sich eine weitere Zentrifugaton für 15 Minuten bei 1000 UpM anschloss. Die Waschschritte mittels Fixativ erfolgten mehrmals, um ein reines und qualitativ gutes Lymphozytenpellet zu erhalten.

Die Erstellung des Tropfpräparates erfordert einen gut gekühlten, sauberen, mit 100 % Ethanol entfetteten Objektträger. Das Lymphozytenpellet wurde mit maximal 0,5 ml Fixativ aufgeschwemmt. 20 µl der Suspension wurde mittels Pipette aus wenigen Zentimetern Höhe auf das obere Drittel des leicht schräg über Wasserdampf gehaltenen Objektträgers aufgetropft und das Tropfpräparat anschließend vor Durchführung der FISH einige Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

2.3.1 Verwendete Sonden

Zur Verwendung kamen in der vorliegenden Arbeit Multicolor-Whole-Chromosome-Painting-Kits für die Chromosomen 1, 2 und 4 (WCP 1, 2, 4, Vysis, Downers Grove, USA). Chromosom 1 wurde mit entsprechendem Filter grün und Chromosom 2 orange abgebildet. Die Hintergrundfärbung wurde mit DAPI vorgenommen. Da sich Chromosom 4 mit dem Spectrum aqua nicht von der Hintergrundfärbung DAPI differenzieren ließ, konnte Chromosom 4 nicht berücksichtigt werden.

2.3.2 Durchführung

Um eine unspezifische Hybridisierung der Sonde mit Zellbestandteilen oder mit Sequenzen außer der Zielsequenz zu vermeiden, war zu Beginn eine Vorbehandlung der Präparate erforderlich, welche neben der RNAse A- und Pepsin-Behandlung auch eine Nachfixierung in Formaldehyd umfasste.

Als erster Schritt wurden 500 µl RNAse A-Lösung (100 µg/ml) auf das angefertigte Tropfpräparat aufgetragen, mit einem Parafilmstreifen luftblasenfrei abgedeckt und für 1 Stunde in einer mit 37 °C vorgewärmten Feuchtekammer inkubiert, bevor sich eine Waschung für je 5 Minuten bei Raumtemperatur in 2 x Standard-Saline-Citrat (SSC, 20-fache Stammlösung entspricht 175,3 g NaCl, 88,2 g Trinatriumcitrat-dihydrat ad 1 Liter Aqua destilata, pH 7,0), in 1 x phosphatgepufferter Saline (PBS, 10-fache Stammlösung entspricht 8 g NaCl, 0,2 g KCL, 1,44 g Na_2HPO_4, 0,24 g KH_2PO_4 ad 1 Liter Aqua destilata, pH 7,0) und in einer Mischung aus 1 x PBS mit $MgCl_2$ (950 ml 1 x PBS und 50 ml 1 M $MgCl_2$) anschloss. Für die nachfolgende Pepsin-Behandlung, zur Förderung der Permeabilisierung des Präparates und Entfernung von Zytoplasmaresten, wurde der Objektträger für 30 Sekunden in einer 37 °C vorgewärmten Mischung aus 0,75 ml 1 M HCL, 74,25 ml Aqua destilata und 37,5 µl Pepsin-Stammlösung (100 mg/ml) inkubiert. Nach der Waschung mit 1 x PBS und der Mischung aus 1 x PBS mit $MgCl_2$ für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur, folgte die Weiterbehandlung mit Formaldehyd (Lösung aus 73 ml PBS mit $MgCl_2$ und 2 ml Formaldehyd 37 %). Letztere diente der Fixierung des Präparates und geschah in Form einer zehnminütigen Inkubation, anschließender Waschung mit 1 x PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur, sowie einer Entwässerung mittels einer Alkoholreihe in aufsteigender Konzentrationen von 70, 90 und 100 %igem Ethanol für je 3 Minuten. Der nächste Schritt bestand aus der Denaturierung der Sonde und der Zielsequenz. Nach einer anfänglichen Rehydrierung des Präparates in einer Alkoholreihe in absteigender Konzentration von 100, 90, 70 und 50 %igem Ethanol für je 1 Minute und einer anschließenden einminütigen Waschung in 0,1 x SSC bei Raumtemperatur, fand die eigentliche Denaturierung des biologischen Präparates bei einer Temperatur von 70 °C in einer 2 x SSC-Lösung über einen Zeitraum von 30 Minuten statt. Nach Abkühlung des Objektträgers auf Raumtemperatur, wurde dieser für je 1 Minute mit 0,1 x SSC und 0,07 M NaOH bei Raumtemperatur und 0,1 x SSC und 2 x SSC bei 7 °C behandelt, bevor sich eine weitere Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 50, 70, 90 und 100 %igem Ethanol für je 1 Minute anschloss. Die parallel durchgeführte Denaturierung der Sonde erfolgte getrennt vom biologischen Präparat. Hierfür wurden in einem lichtdichten Cup 2 µl autoklaviertes Aqua destilata, 7 µl Hybridisierungspuffer und 1 µl Sonde pro Objektträger pipettiert, vermischt und bei 75 °C für 5 Minuten im Wasserbad denaturiert. Schließlich wurden zur Durchführung der Hybridisierung 10 µl des Sondenmixes auf das Präparat mit der Zielsequenz aufgetragen, mit einem Deckglas der Größe

24 x 24 mm luftblasenfrei abgedeckt und in einer Feuchtekammer bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Am zweiten Tag der FISH waren Waschschritte zur Entfernung locker gebundener Sonden vorgesehen. Hierfür wurde der Objektträger nach Ablösen des Deckglases für 5 Minuten in 1 x SSC bei 75 °C gereinigt, dann mit 2 x SSC/0,05 % Tween 20 für 5 Minuten bei Raumtemperatur behandelt und nach Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70, 90 und 100 %igem Ethanol für je 1 Minute, getrocknet. Abschließend erfolgte die Gegenfärbung mit 15 µl DAPI (5 µg/ml).

2.4 Quantifizierung der Chromosomenaberrationen

Die quantitative Auswertung der Chromosomenaberrationen erfolgte nach dem PAINT-Protokoll nach Tucker et al. von 1995 [37]. Es wurden 1000 Zellen pro Blutentnahmezeitpunkt mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Oberkochen) bei 1000-facher Vergrößerung durch dieselbe Person ausgewertet. Zur Auswertung kamen ausschließlich vollständige Mitosen mit 46 Chromosomen. Daher wurden numerische Aberrationen nicht berücksichtigt, da sie von diesem Einschlusskriterium abwichen.

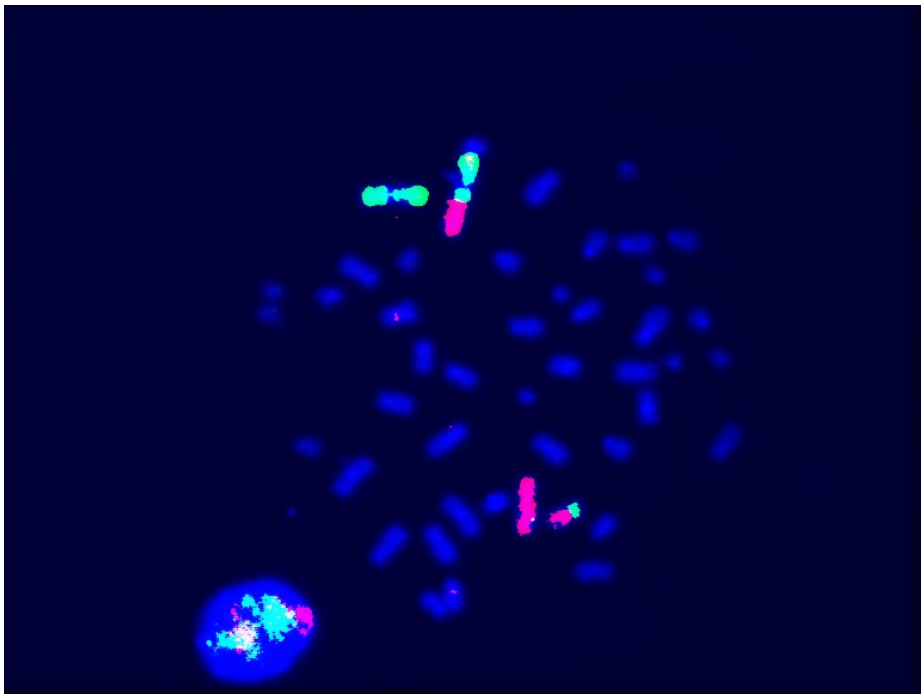

Abbildung 2.1: Chromosomenaberration zwischen Chromosom 1 (grün markiert) und Chromosom 2 (rot markiert). Es resultiert ein dizentrisches Chromosom (dic(BC)) und ein zweifarbiges Fragment (ace(bc)).

Als Zellen ohne Aberrationen wurden solche gezählt, die 46 Chromosomen mit entsprechend zwei orange und zwei grün gemarkerten Chromosomen aufwiesen. Sich

überlappende Kerne wurden nicht ausgewertet, ebenso keine Kerne mit diffusen oder fehlenden FISH-Signalen, denn eine eindeutige, homogene und vollständige Chromosomenfärbung, frei von Artefakten, ist Voraussetzung zur sicheren Interpretation und Quantifizierung der Chromosomenaberrationen. Da nur zwei unbedingt unterschiedlich gefärbte Chromosomen eine Differenzierung ermöglichen, konnten Austausche zwischen zwei unterschiedlichen Chromosomen mit selber Färbung nicht differenziert und somit nicht berücksichtig werden. Nicht markierte Fragmente wurden nicht erfasst, so dass auch die azentrischen Fragmente sicher gefärbt sein mussten. Als Chromosomenschäden wurden Translokationen, dizentrische gemarkerte Chromosomen, Insertionen und azentrische Bruchstücke, wenn sie nicht überzählig waren, betrachtet und zusammengefasst (Abbildung 2.1). Überzählige Bruchstücke wurden nicht berücksichtigt.

2.5 Patientenkollektiv

Die Dosis-Wirkungskurve wurde beispielhaft an 10 Patienten auf ihre Anwendbarkeit hin überprüft. Die Stichprobe umfasste 7 Frauen und 3 Männer im Alter zwischen minimal 47 und maximal 83 Jahren (Median 73,5 Jahre, Mittelwert 70,9 Jahre), welche keiner laufenden Chemotherapie oder Bestrahlung unterlagen. Bei 9 Patienten bestand als Grunderkrankung eine aktivierte Gonarthrose, bei einem eine Oligoarthritis. In die Auswertung gelangten Patienten, welche eine RSO des Kniegelenkes mit ^{90}Y bei aktivierter Arthrose/Oligoarthritis erhielten, ihr Einverständnis zur Erhebung ihrer Daten gaben und die erforderlichen Blutentnahmetermine unmittelbar vor der RSO und genau 28 Tage nach der RSO wahrnahmen. Hatten die Patienten in dem Intervall zwischen der ersten und der zweiten Blutentnahme eine Strahlentherapie erhalten, eine Änderung ihrer Medikation oder eine radiologische Diagnostik, so wurden sie rückwirkend aus dem Kollektiv ausgeschlossen. Für die Datenerhebung mit Patientenbeteiligung lag ein positives Votum der lokalen Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Universität Gießen vor.

2.6 Radiosynoviorthese

2.6.1 RSO-Durchführung

Zur Untersuchung kamen ausschließlich RSO der Kniegelenke mit intraartikulärer Applikation des Radionuklids ^{90}Y-Citrat oder ^{90}Y-Silikat. Bei allen RSO fand vorab eine Lokalanästhesie mit Bupivacain (0,2 bis 2 ml) von Haut und Weichteilen statt, jedoch ohne intraartikuläre Injektion des Lokalanästhetikums. Die Kontrolle der Nadellage im Gelenkkavum zur intraartikulären Injektion von ^{90}Y geschah mittels Abpunktion von

Gelenkflüssigkeit oder durch Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung. War ein Kniegelenkserguss vorhanden, so wurde dieser so weit wie möglich zuvor abpunktiert. Die applizierte Aktivität des ^{90}Y betrug zwischen minimal 218 bis maximal 237 MBq (Median 228,5 MBq, Mittelwert 227,8 MBq). Bei 7 Patienten kam ^{90}Y-Silikat, bei 3 Patienten ^{90}Y-Citrat zur Anwendung. Nach Injektion des ^{90}Y wurde durch die selbe Nadel ein Kortikoid (5 bzw. 20 mg Triamcinolon-Hexazetonid (Lederlon) oder Triamcinolon-Azetonid (Volon A) in äquivalenter Dosis von 10 bzw. 40 mg, je nach Verfügbarkeit) injiziert, um das Risiko einer Strahlensynovialitis zu verringern. Im Anschluss fand eine Ruhigstellung des Kniegelenkes mittels einer dorsalen Hartschaumschiene (Krewifract, Krewi Medical Product GmbH, Willich) über einen Zeitraum von 3 Tagen statt. Die Durchführung der RSO geschah bei allen Patienten durch denselben Arzt.

2.6.2 Aktivitätsabtransport

3 Tage nach Durchführung der RSO erfolgte bei allen Patienten zum Nachweis bzw. zum Ausschluss eines lymphogenen Aktivitätsabtransportes des Radionuklids aus dem Kniegelenk eine Ganzkörperszintigraphie mittels Zweikopf-Gammakamera mit Hochenergiekollimator (Bodyscan, Fa. Siemens, Erlangen) unter Ausnutzung der Bremsstrahlung des Betastrahlers ^{90}Y. Die Szintigraphie wurde in anteriorer und posteriorer Sicht in einem Energiefenster von 55 bis 284 keV, mit einer Scangeschwindigkeit von 5 cm/Minute und einer Matrix-Größe von 512 x 184 Pixeln durchgeführt. War im Rahmen der visuellen Beurteilung eine Aktivität außerhalb des Kniegelenkes erkennbar, so wurde dieser Aktivitätsabtransport mittels der Region-of-interest-(ROI-)Technik bestimmt. Zum Zeichnen der ROI wurde das Szintigramm auf das lokale Maximum des entsprechenden Bereiches ausgesteuert. Die in der dorsalen Sicht gezeichneten Bereiche, in denen sich die Aktivität vom Hintergrund abhob, wurden in die anteriore Sicht übertragen und gespiegelt. Die Hintergrund-ROI wurde außerhalb des Körpers in der Höhe des Kopfes gezeichnet und ebenfalls in die andere Perspektive kopiert (Abbildung 2.2).

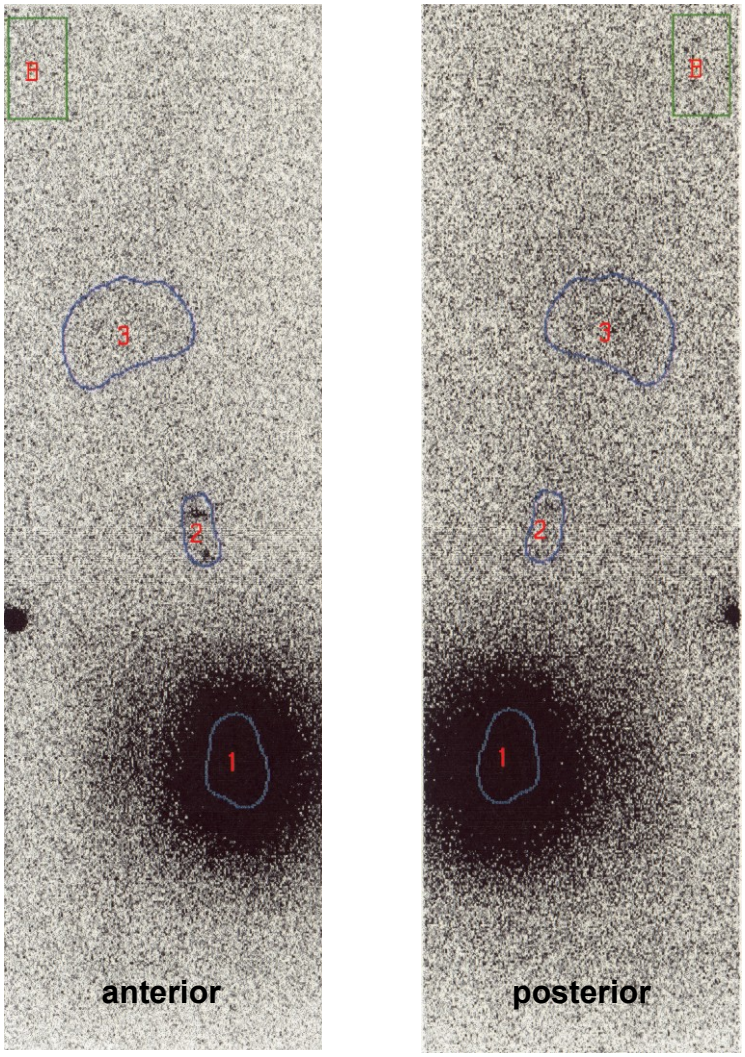

Abbildung 2.2: Auswertung der Ganzkörperszintigraphie der Bremsstrahlung mit 1: Kniegelenk-ROI; 2: Lymphknoten-ROI; 3: Leber-ROI; B: Hintergrund-ROI

Hinsichtlich der Lymphknoten wurden alle sichtbaren Lymphknoten in die ROI eingeschlossen (inguinal und iliacal) und die Größe der Leber-ROI dem sichtbaren Teil der Leber gleichgesetzt. Die Größe der Knie-ROI wurde so gewählt, dass die Streustrahlung nicht mit eingeschlossen wurde. Die mit der Hintergrund-ROI erhaltenen Impulszahlen wurden flächennormiert von den Impulszahlen der ROI um die eigentliche Aktivität abgezogen. Das geometrische Mittel aus den Impulszahlen der anterioren und posterioren Sicht ergab die entgültige Impulszahl der ROI.

Anschließend erfolgte die Berechnung des prozentualen Anteils der abtransportierten Aktivität nach der Formel:

$$\text{Abtransport (\%)} = \frac{\text{Impulse Organ}}{\text{Impulse (Kniegelenk + Lymphknoten + Leber)}} * 100$$

Der gesamte Aktivitätsabtransport ergab sich aus der Summe der Aktivitätsabtransporte der Einzelorgane. War visuell keinerlei Abtransport zu erkennen, wurde der prozentuale Anteil auf null gesetzt. Über den prozentual ermittelten Abtransport und der applizierten Aktivität in MBq ließ sich die lymphogen abtransportierte Aktivität rückrechnen. Die angeführte Vorgehensweise und Berechnung zur Bestimmung des Aktivitätsabtransportes wurde gewählt, da sie sich im Rahmen einer Studie über Mess- und Auswertemethoden für den Aktivitätsabtransport bei der RSO des Kniegelenkes unter Berücksichtigung der Streu- und Absorptionsverhältnisse als am genauesten erwies [52].

2.7 statistische Hilfsmittel

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit STATISTICA für Windows, Version 5.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Signifikanzen wurden nach dem Vorzeichentest bestimmt. Es war davon auszugehen, dass eine Zunahme der Chromosomenaberrationen unmittelbar auf eine Strahlenexposition zurückzuführen war. Da eine Abnahme der Chromosomenaberrationen als nicht strahlenbedingt gewertet wurde, kam daher ein einseitiger Test zur Anwendung. Eine Zunahme der Chromosomenschäden wurde dann als nicht zufällig angesehen, wenn sich die Zahl der Schäden vor und nach der RSO mittels Vorzeichentest auf dem 5 % Niveau signifikant unterschied.

3 Ergebnisse

3.1 Kobalt-60-Dosis-Wirkungskurve

Die bei der in-vitro-Bestrahlung der Blutlymphozyten mittels Teilkörperdosimeter gemessenen Dosiswerte wichen von den Zielwerten ab. Die Aberrationen der unbestrahlten Probe wurden mit 5 auf 1000 Zellen bestimmt, entsprechend einer Hintergrundfrequenz von 0,005 Chromosomenaberrationen pro Zelle. Ab einer Dosis von 535 mGy ließ sich ein signifikanter dosisabhängiger Anstieg der Chromosomenaberrationen erkennen, so dass die Messpunkte unterhalb dieser Dosis nicht für die Erstellung der Dosis-Wirkungskurve herangezogen wurden (Tabelle 3.1).

Dosis [mGy]	tats Dosis [mGy]	tats Dosis [Gy]	Aber	Aber Diff	signifikant
0	0	0	5	0	
200	223	0,223	6	1	0
300	356	0,356	11	6	0
400	390	0,39	8	3	0
500	603	0,603	18	13	1
600	535	0,535	19	14	1
700	737	0,737	27	22	1
800	920	0,92	43	38	1
900	999	0,999	41	36	1
1000	1033	1,033	41	36	1

Tabelle 3.1: Ermittelte Parameter zur Erstellung der ^{60}Co-Dosis-Wirkungskurve.

Tab. 3.1: Zieldosis in mGy (Dosis [mGy]), tatsächlich durch Dosimeter ermittelte Dosis in mGy (tats Dosis [mGy]), tatsächliche durch Dosimeter ermittelte Dosis in Gy (tats Dosis [Gy]), absolute Chromosomenaberrationen von je 1000 ausgewerteten Zellen anhand des PAINT-Protokolls quantitativ erfasst (Aber), Aberrationsdifferenzen im Vergleich zur unbestrahlten Probe (Aber Diff), Anstieg der Aberrationen mit 0 = nicht signifikant und 1 = signifikant.

Die Aberrationsdifferenzen pro Zelle wurden gegen die tatsächliche Dosis in Gy in einer Punktwolke aufgetragen (Abbildung 3.1).

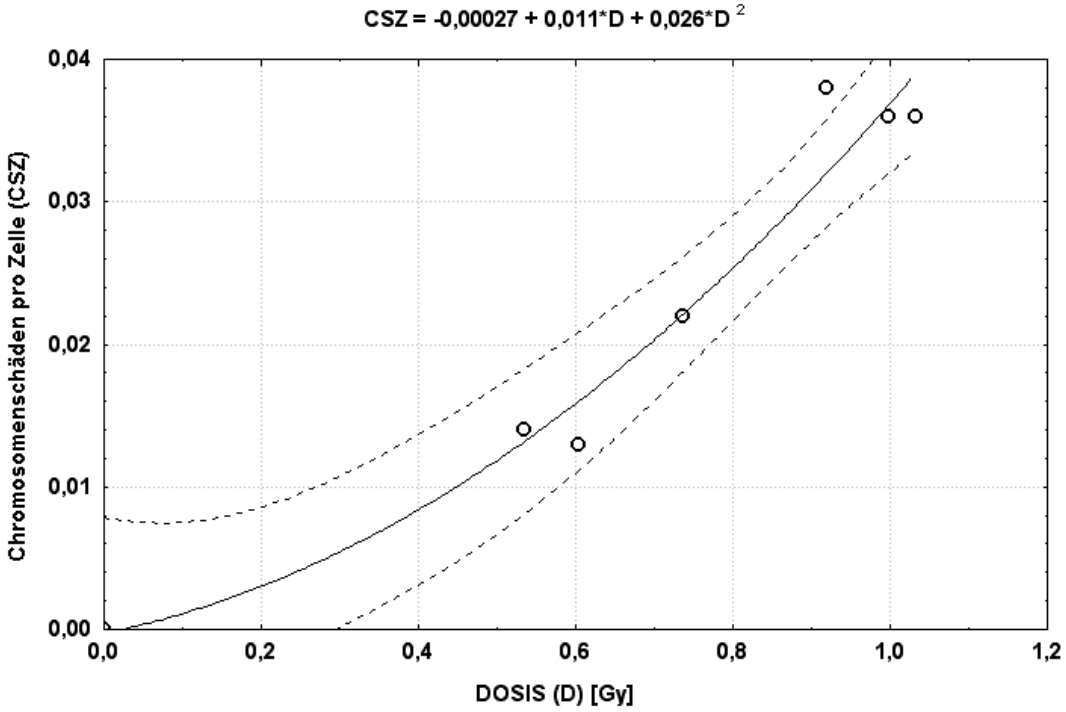

Abbildung 3.1: ^{60}Co-Dosis-Wirkungskurve

Abb. 3.1: Die Y-Achse gibt die Zunahme der Chromosomenschäden pro Zelle und die X-Achse die tatsächliche Dosis in Gy an, die gestrichelten Linien entsprechen dem 95 % Konfidenzintervall.

Die Verteilung der Chromosomenaberrationen in Abhängigkeit von der Dosis der ^{60}Co-Gammastrahlung in Gy wird durch eine linear quadratische Funktion beschrieben: $Y = c + \alpha D + \beta D^2$ mit –0,00027 für c, einem α von 0,011 und einem β von 0,026. Bei Umkehrung der Dosis-Wirkungskurve resultiert die Berechnung der Dosis in Gy aus der Zunahme der Chromosomenschäden pro Zelle (Abbildung 3.2). Dem entsprechend wurde die Patientendosis ermittelt.

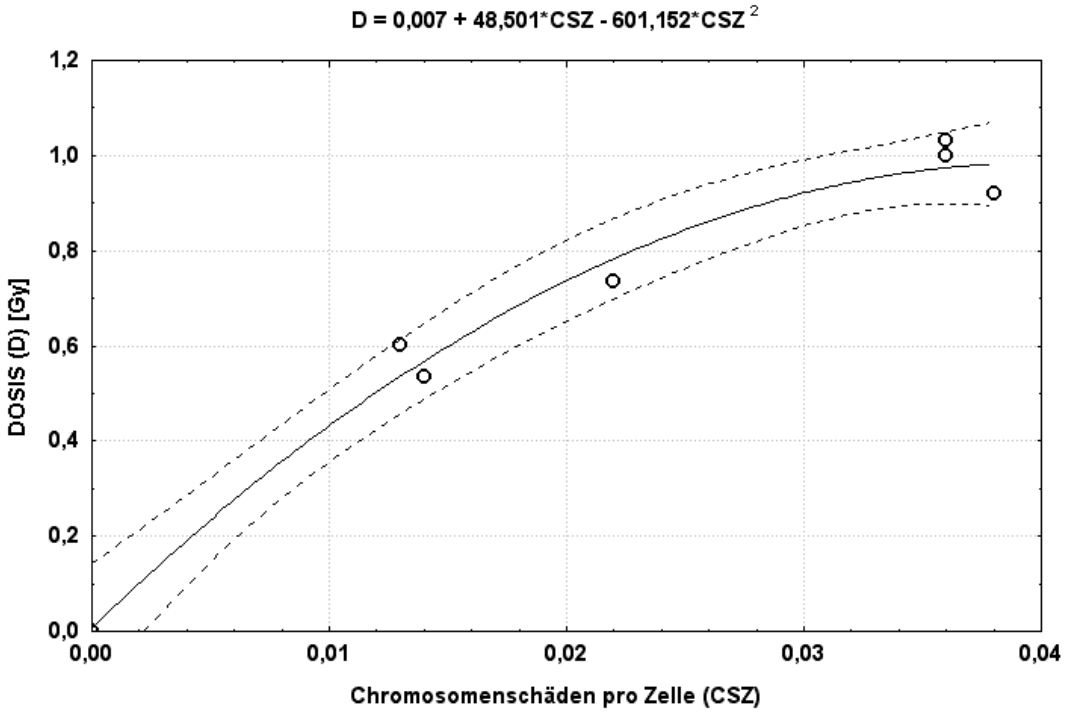

Abbildung 3.2: Kurve für die Berechnung der Dosis aus der Zunahme der Chromosomenschäden pro Zelle.

3.2 Biologische Dosimetrie am Patientenkollektiv

Anhand der quantitativ bestimmten Chromosomenaberrationen der Patienten vor und 28 Tage nach Durchführung der RSO wurde die Aberrationsdifferenz bestimmt und anschließend nach dem Vorzeichentest auf Signifikanz geprüft. Es fand sich bei keinem der 10 Patienten ein signifikanter Anstieg der Chromosomenaberrationen im Vergleich vor und 28 Tage nach der RSO, so dass eine Zuordnung zu den tatsächlich erhaltenen Dosen nicht möglich war. Daraufhin wurde die für eine Signifikanz erforderliche Zunahme der Chromosomenschäden, ausgehend von den Chromosomenaberrationen vor der RSO, nach dem Vorzeichentest berechnet und jeweils auf 1000 ausgewertete Metaphasen bezogen. Unter Anwendung der Dosis-Wirkungskurve wurde anhand dieser berechneten Chromosomenschäden pro Zelle im Sinne einer Abschätzung nach oben dem Patienten die Dosis, die dieser berechneten Zunahme entsprach, zugeordnet und ein Dosisminimum mit 234,5 mGy und ein Dosismaximum mit 467,8 mGy (Mittelwert 319,58 mGy ± empirische Standardabweichung s = 64,59 mGy) bestimmt (Tabelle 3.2).

Pat	Aktivität [MBq]	Aber vor	Aber nach	Aber Diff	erf Diff	signifikant	Dosis [Gy]	Dosis [mGy]
1	229	1	2	1	6	0	0,2764	276,4
2	219	5	8	3	8	0	0,3565	356,5
3	228	1	4	3	6	0	0,2764	276,4
4	233	3	4	1	7	0	0,3171	317,1
5	229	0	2	2	5	0	0,2345	234,5
6	225	3	1	-2	7	0	0,3171	317,1
7	226	1	3	2	6	0	0,2764	276,4
8	237	12	17	5	11	0	0,4678	467,8
9	218	5	1	-4	8	0	0,3565	356,5
10	234	3	9	6	7	0	0,3171	317,1
Σ	2278	34	51	17	17	1	0,877	877

Tabelle 3.2: Patientenbezogene Daten der biologischen Dosimetrie.

Tab. 3.2: Auflistung der Auswertung von 10 Patienten (Pat) mit Angabe der applizierten Aktivität des Radionuklids ^{90}Y in MBq (Aktivität [MBq]), Aberrationen unmittelbar vor der RSO (Aber vor) und 28 Tage nach der RSO (Aber nach) und die ermittelten Differenzen der Werte (Aber Diff), sowie die für eine Signifikanz erforderlichen Differenzen (erf Diff) mit einem Anstieg der Aberrationen mit 0 = nicht signifikant und 1 = signifikant und die Angabe der berechneten Patientendosen in Gy (Dosis [Gy]) und in mGy (Dosis [mGy]). Die abschließende Zeile bezieht sich auf das Gesamtkollektiv.

Die Dosen, welche die Patienten durch die RSO tatsächlich erhalten hatten, lagen somit unter den angegebenen, berechneten Dosen. Die Chromosomenaberrationen des Gesamtkollektivs ergaben im Gegensatz zu der Betrachtung des Einzelpatienten einen signifikanten Anstieg der Chromosomenaberrationen, und es ließ sich daher direkt eine Dosis mittels der Dosis-Wirkungskurve für das Gesamtkollektiv ermitteln. Ein Rückschluss des biologischen Effektes vom Gesamtkollektiv auf den Einzelpatienten ist jedoch nicht möglich.

3.3 Aktivitätsabtransport

Im Patientenkollektiv fand sich bei nur einem Patienten ein lymphogener Aktivitätsabtransport aus dem Kniegelenk in die Lymphknoten und in die Leber mit einem prozentualen gesamten Abtransport von 3,9 %, entsprechend 9,1 MBq. Bei zwei weiteren Patienten kam es zu einem nachweisbaren lymphogenen Aktivitätsabtransport ausschließlich in die Leber mit einem prozentualen Anteil von 4,8 % (10,5 MBq) und 1,7 % (3,9 MBq) (Tabelle 3.3).

Pat	Anteil LK [%]	Anteil Leber [%]	Abtrans ges [%]	MBq
1	0	0	0	0
2	0	4,8	4,8	10,5
3	0	1,7	1,7	3,9
4	1,2	2,7	3,9	9,1
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0

Tabelle 3.3: Aktivitätsabtransportwerte des Patientenkollektivs.

Tab. 3.3: Auflistung der Auswertung der 10 Patienten (Pat) mit dem prozentualen Anteil der abtransportierten Aktivität in die Lymphknoten (Anteil LK [%]) und in die Leber (Anteil Leber [%]), dem prozentualen Anteil der abtransportierten Aktivität von der applizierten Aktivität (Abtrans ges [%]) und der abtransportierten Aktivität (MBq).

Dennoch lag bei keinem dieser 3 Patienten eine signifikante Chromosomenaberrationszunahme nach der RSO vor. Die maximale tatsächliche Chromosomenaberrationsdifferenz von 6 wurde im Gesamtkollektiv bei einem Patienten ohne Nachweis eines Aktivitätsabtransportes bestimmt und war letztlich nicht signifikant. Gemäß den

vorliegenden Daten ist bis zu einem lymphogenen Aktivitätsabtransport von 4,8 %, entsprechend einer Aktivität von 10,5 MBq kein biologischer Effekt zu erwarten, jedoch ist aufgrund der geringen Fallzahl der Patienten, welche einen Aktivitätsabtransport aufwiesen, keine sichere Aussage über den Zusammenhang von Aktivitätsabtransport und Chromosomenschäden möglich.

4 Diskussion

Zur Durchführung einer biologischen Dosimetrie wurde eine ^{60}Co-Dosis-Wirkungskurve mit Translokationen als zytogenetische Endpunkte neu erstellt. Am Anwendungsbeispiel der RSO des Kniegelenkes mit ^{90}Y fand sich in dem betrachteten Patientenkollektiv von 10 Patienten jedoch bei keinem ein signifikanter Anstieg von lymphozytären Chromosomenschäden im Vergleich vor und 28 Tage nach Durchführung der RSO, auch nicht bei den Patienten, bei denen ein lymphozytärer Abtransport zu verzeichnen war. Im Gegensatz dazu war im Gesamtkollektiv eine signifikant erhöhte Chromosomenaberrationsdifferenz nachzuweisen.

4.1 Chromosomen

Unter der Annahme, dass die Chromosomen 1 und 2 als größte Chromosomen am ehesten in Translokationen mit eingebunden sind und im Vergleich zu anderen Chromosomen daher die größte Ausbeute an Translokationen bieten würden, wurden unter diesem Aspekt in der vorliegenden Arbeit die Whole-Chromosome-Paintings der Chromosomen 1 und 2 ausgewählt.

Die Chromosomen 1 und 2 gehören hinsichtlich der Anzahl der Megabasenpaare (Mbp) zu den größten Chromosomen, wobei Chromosom 1 mit 263 Mbp und Chromosom 2 mit 255 Mbp bei einer Größe des Gesamtgenoms von 3200 Mbp angegeben werden [53]. Es wird davon ausgegangen, dass die größte Wahrscheinlichkeit der Chromosomen in Aberrationen involviert zu sein, von ihrem DNA-Gehalt abhängt [12]. Den Einfluss der Chromosomengröße auf die Translokationsfrequenz bestätigt auch die Arbeit von Cafourková et al. [7], welche mit 3 und 5 Gy Gammastrahlung induzierte Translokationsfrequenzen zwischen 11 Chromosomen, einschließlich Chromosom 1 und 2 unter Anwendung des PAINT-Protokolls von Tucker et al. [37] auswerteten. Im Vergleich der, aufgrund des DNA-Gehaltes, rechnerisch zu erwartenden Translokationsfrequenzen mit den experimentell detektierten, fand sich überwiegend kein signifikanter Unterschied. Auffallend war jedoch die geringste Translokationsfrequenz von 32,5 % zwischen Chromosom 2 und den beobachteten weiteren 10 Chromosomen im Verhältnis zu seiner absoluten Translokationsanzahl. Ebenso waren die absolut betrachteten Translokationen von Chromosom 2 mit den weiteren 10 Chromosomen signifikant geringer, als rechnerisch aufgrund seines DNA-Gehaltes erwartet. Translokationen des Chromosoms 2 sollen gemäß der Autoren daher häufiger zwischen Chromosomen außerhalb der von Cafourková et al. [7] gewählten Chromosomengruppe stattfinden als innerhalb. Demnach wäre auch eine geringere Translokationsfrequenz

zwischen den Chromosomen 1 und 2, welche beide Anteil der gewählten Chromosomengruppe waren, zu erwarten. In der Betrachtung der absoluten Translokationen zwischen den Chromosomen 1 und 2 nach Bestrahlung mit 3 Gy fanden sich jedoch 11 experimentell detektierte Translokationen gegenüber den, aufgrund des DNA-Gehaltes mit 11,8 berechneten [7]. Da in einer Arbeit von Bickmore und Teague [54] Translokationen zwischen den Chromosomen 17, 19 und 22 häufiger beobachtet wurden, als ihrer Größe nach zu erwarten gewesen wäre, ist auch die Lage der Chromosomen im Zellkern sowie ihre Gendichte als Einflussfaktor auf die Translokationswahrscheinlichkeit zu berücksichtigen. Da dennoch die Chromosomengröße in Mbp den Hauptfaktor hinsichtlich der Translokationswahrscheinlichkeit auszumachen scheint [54, 55], steht dies nicht im Widerspruch zu der Wahl der Chromosomen 1 und 2.

4.2 Zytogenetischer Endpunkt

Die biologische Dosimetrie dient der Abschätzung einer erhaltenen Strahlendosis wie beispielsweise nach einer Exposition einer ionisierenden Strahlung, um ein erhöhtes Krebsrisiko kalkulieren zu können [3]. Hierfür sind von der Strahlendosis abhängige, zytogenetische Parameter, welche vergleichbare Ergebnisse in vivo und in vitro liefern, erforderlich. Chromosomenaberrationen korrelieren in diesem Zusammenhang mit dem Krebsrisiko wie kein anderer Biomarker [3]. Daher wurden in dosimetrischen Studien über ionisierende Strahlung bisher als zytogenetische Endpunkte dizentrische Chromosomenaberrationen, Translokationen und in geringerem Ausmaß auch Mikronuklei gewählt. SCA waren bei mangelnder Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung diesbezüglich unbedeutend [18]. In der biologischen Dosimetrie standen im Zusammenhang mit der RSO unter Anwendung von Radionukliden bisher dizentrische Chromosomen und Mikronuklei im Fokus. Mikronuklei sind ein indirekter Nachweis einer Zellkernschädigung und ihre quantitative Relation zur Dosis ionisierender Strahlung ist weniger gut gesichert [5, 18]. Zusätzlich weisen sie bei einer sehr großen Hintergrundfrequenz von 10 bis 12 Mikronuklei auf 1000 Zellen eine hohe interindividuelle Variabilität auf [18]. Prosser et al. [50] beobachteten sogar eine Hintergrundfrequenz von 20 auf 1000 Zellen. Zu berücksichtigen ist, dass nicht alle azentrischen Fragmente in Mikronuklei „verpackt“ werden [5]. Des Weiteren ist eine Fehlbestimmung durch nachfolgende Zellteilungen, in denen Mikronuklei wieder verloren gehen oder wieder in den Zellkern aufgenommen werden, möglich, und es kann durch Teilung bereits vorhandener Mikronuklei zur Bildung zusätzlicher Mikronuklei kommen [56]. Aufgrund der angeführten Problematik hat der Mikronuklei-Test die zytogenetischen Testverfahren in der biologischen Dosimetrie bisher nicht ersetzten können [5].

Die in dieser Arbeit präferierte FISH eröffnet als ein neues Bindeglied zwischen der Zytogenetik und der Molekulargenetik ein Verfahren zum Nachweis chromosomaler Rearrangements und bietet den Vorteil, die langlebigen Translokationen nachweisen zu können. Da stabile Chromosomenaberrationen wie Translokationen nicht automatisch mit einem Verlust, sondern mit einer Umlagerung genetischen Materials verbunden sind, lassen sie sich nicht mit der Giemsa-Färbung als klassisches zytogenetisches Testverfahren, wie es zur Darstellung struktureller Chromosomenaberrationen wie beispielsweise bei Brüchen, dizentrischen Chromosomen oder Ringen sinnvoll ist, nachweisen, sondern erfordern eine spezifische Markierung einzelner Chromosomen mit der FISH. Translokationen führen nicht zum Zelltod, sie können jedoch schwerwiegende genetische Effekte wie beispielsweise neoplastische Transformationen verursachen, weshalb sie zur Abschätzung eines strahleninduzierten Krebsrisikos beitragen können [9]. Im Hinblick auf eine retrospektive Dosisermittlung bei größeren Zeitintervallen zwischen Strahlenexposition und Blutprobengewinnung haben strahleninduzierte Translokationen seit ihrer ersten visuellen dosimetrischen Analyse in menschlichen Zellen unter Einsatz der FISH durch Lucas et al. [27] einen entscheidenden Stellenwert eingenommen, so dass ihre Anwendung auch in der biologischen Dosimetrie im Zusammenhang mit nuklearmedizinischen Therapieverfahren mit Radionukliden ihre Berechtigung finden. Daher wurden für die vorliegende Arbeit mittels FISH darstellbare Translokationen als zytogenetische Endpunkte gewählt.

Translokationen sind durch ein einfaches Farbmuster leicht erkennbar und minimieren dadurch Fehler in der Auswertung, welche außerdem mit weniger zeitlichem und personellem Aufwand als bei den konventionellen Färbemethoden durchgeführt werden kann [5, 9, 27]. Automatisierte Nachweisverfahren unter Einsatz von speziellen Softwareprogrammen sollen bei der Auswertung von Translokationen einen zusätzlichen Zeitgewinn um den Faktor 10 ermöglichen und können zu einer rasch und routinemäßig einsetzbaren biologischen Dosimetrie führen [9]. Des Weiteren sind die Ansprüche an gute Metaphasendarstellungen für die Auswertung von Translokationen durch die FISH-Technik nicht so hoch gesteckt, wie für konventionelle Bänderungsanalysen [27]. Da Translokationen über die Zeit im Körper kumulieren, werden sie häufig mit einer „Lebenszeitdosis“ gleichgesetzt [3, 15]. Hier liegt die Nische der Translokationen in der biologischen Dosimetrie, denn durch das Ermöglichen von Dosisabschätzungen lang zurückliegender, chronischer oder kumulativer Strahlenexpositionen gelten Translokationen für diese Ereignisse, trotz ihrer erhöhten Hintergrundfrequenz, als die Chromosomenaberrationen der ersten Wahl [5, 9, 21] und haben daher in der biologischen

Dosimetrie zunehmend an Bedeutung gewonnen, so dass sie als stabile Chromosomenaberrationen im Hinblick auf eine retrospektive Dosisermittlung bei langen Zeitintervallen zwischen Strahlenexposition und Zellgewinnung der bessere Biomarker sind. Bei der Datenerfassung von Translokationen ist die Untersuchung von Zellen, welche in Kultur die zweite Mitose erreicht haben, weniger kritisch zu bewerten, denn eine Minderung der Aberrationsausbeute durch Eingehen der Zellen in die zweite Mitose war nicht zu erwarten [11], und somit war eine Kontrolle der Anzahl durchlaufener Mitosen mit dem Thymidinanalogon 5-Brom-2`-desoxyuridin (BrdU) und ggf. Darstellung von Harlekin-Chromosomen nicht erforderlich. Anders verhält es sich bei den dizentrischen Chromosomenaberrationen, welche als instabile Aberrationen in einer der nachfolgenden Zellteilungen zum Absterben der Zelle führen und damit der Analyse entgehen. Durch den Übergang der Zelle von der ersten in die zweite Mitose fallen Dizentrische in der Anzahl um den Faktor 2 bis 4 ab, und es ist daher zwingend eine Untersuchung der Zellen in der ersten Mitose erforderlich [5, 21]. Des Weiteren fällt die Anzahl der dizentrischen Aberrationen auch mit der Zeit nach der Bestrahlung ab [15]. Aufgrund der angeführten Vorteile von Translokationen als zytogenetische Endpunkte in der biologischen Dosimetrie und insbesondere um Unsicherheiten hinsichtlich der Auswertung und des Verlusts von Aberrationen durch das Zeitintervall von einem Monat zwischen der Strahlenexposition des Patienten und der Blutgewinnung gering zu halten, wurden in der vorliegenden Arbeit unter Inkaufnahme des Kostenaufwandes, welcher die FISH mit sich bringt, Translokationen als zytogenetische Endpunkte gewählt.

Da jedoch nach 11 Tagen bei ^{90}Y mit einer Halbwertzeit von 64 Stunden mehr als 95 % der Dosis im Gewebe ist, könnte bereits dann eine Chromosomenanalyse erfolgen. Dizentrische Chromosomenaberrationen bieten für dieses Zeitintervall kaum Unsicherheiten [17, 51]. Hinzu kommt eine geringere interindividuelle Variabilität und eine geringere Hintergrundfrequenz der dizentrischen Chromosomen gegenüber den Translokationen, mit nachfolgend positiver Auswirkung auf die Nachweisempfindlichkeit [15]. Unter Annahme einer optimalen Hintergrundfrequenz von 0 Translokationen wäre in dieser Arbeit eine, für eine Signifikanz notwendige Aberrationszunahme von 5 erforderlich und demnach wäre unter optimalen Voraussetzungen eine idealisierte Nachweisgrenze von 234,5 mGy zu erwarten. Die maximale Aberrationsdifferenz innerhalb des Patientenkollektivs lag einmalig bei 6 Translokationen und einmalig bei 5 Translokationen und in der übrigen Zahl der Patienten darunter. Demnach waren die applizierten Strahlendosen des Patientenkollektivs überwiegend unterhalb dieser bestmöglichen

Nachweisgrenze und bestenfalls im Grenzbereich zu postulieren. Daher konnten die hier gefundenen niedrigen, unterhalb dieser Nachweisgrenze liegenden Dosisbereiche des Patientenkollektivs nur durch eine Abschätzung nach oben ermittelt werden, und somit lagen die tatsächlich erhaltenen Dosen der Patienten noch unterhalb der hier angegebenen, berechneten Werte. Bei der Untersuchung von dizentrischen Chromosomen kann hingegen eine Nachweisgrenze von bis zu 10 mGy bei einer Auswertung von 10000 Zellen erreicht werden [5], allerdings unter entsprechendem zeitlichen und personellen Aufwand.

In zukünftigen dosimetrischen Untersuchungen im Niedrigdosisbereich, wie es bei der RSO der Fall ist, sollte der Auswertung dizentrischer Chromosomen gegenüber den Translokationen zu Gunsten der Nachweisempfindlichkeit den Vorzug gegeben werden. Die Anwendbarkeit der Dosis-Wirkungskurve mit Translokationen als zytogenetische Endpunkte liegt indessen bei der biologischen Dosimetrie nuklearmedizinischer Therapieverfahren im Hochdosisbereich, wie beispielsweise bei der Radiojodtherapie mit Dosen von 150 bis 400 Gy [57].

4.3 Dosis-Wirkungskurve

Um eine biologische Dosimetrie mit Translokationen als zytogenetische Endpunkte und mit einer ^{60}Co-Gammastrahlung als Referenzstrahlung durchführen zu können, war es erforderlich eine Dosis-Wirkungskurve in vitro neu zu erstellen, denn mit ^{60}Co-Gammastrahlung erstellte Dosis-Wirkungskurven unter Anwendung der FISH-Technik und Auswertung der Translokationen gemäß dem PAINT-Protokoll sind rar, und es haben sich diesbezüglich noch keine standardisierten Dosis-Wirkungskurven etabliert [5, 19]. Hierfür sind als mögliche Ursachen variierende Bestrahlungskonditionen der Zellen, unterschiedliche Kulturbedingungen und Differenzen in der Auswertung von Chromosomenaberrationen unterschiedlicher Labore anzusehen (Inter-Labor-Variabilität) [28, 58], und es wird daher jedem Labor die Erstellung einer eigenen Dosis-Wirkungskurve, trotz des dadurch entstehenden erhöhten Kosten- und Arbeitsaufwandes, angeraten [16, 28]. Aufgrund der unterschiedlichen subjektiven Bewertungen der Aberrationen durch die Auswerter wurden die Translokationen in der vorliegenden Arbeit von nur einem Auswerter beurteilt. Die Vergleichbarkeit von Dosis-Wirkungskurven wird zusätzlich durch verschiedene betrachtete biologische Effekte (Translokationen, dizentrische Chromosomen, Mikronuklei) auch durch unterschiedlich gewählte Dosisspektren erschwert. Weiterhin ist insbesondere die quantitative Erfassung, der mit FISH-Technik dargestellten Translokationen, durch die Anwendung un-

terschiedlicher Auswertekriterien in den verschiedenen Studien problematisch, und die Ergebnisse können daher nicht unmittelbar miteinander verglichen werden. Es liegt zwischen den Autoren früherer Studien kein einheitlicher Konsens darüber vor, welche mittels FISH darstellbare Aberrationen für eine Dosis-Wirkungskurve erfasst werden sollten [19, 59]. Da das PAINT-Protokoll nach Tucker et al. [37] jedoch eigens für die Vergleichbarkeit in der Forschung aufgestellt wurde, erfolgt die Auswertung in der vorliegenden Arbeit dem entsprechend. Die ermittelten Aberrationen sind nicht als absolute Zahlen in die Wertung eingegangen, sondern es wurde der Aberrationszuwachs, das heißt, die Differenz der Aberrationen vor und nach Durchführung der RSO-Therapie, bestimmt. Eine von Lucas et al. [17] publizierte ^{60}Co-Dosis-Wirkungskurve schloss den, für das Patientenkollektiv in der vorliegenden Studie relevanten Dosisbereich nicht umfangreich genug mit ein und neben dizentrischen Chromosomen wurden reziproke Translokationen als absolute Werte ohne Berücksichtigung des PAINT-Protokolls nach Tucker et al. [37] ausgewertet. In der Arbeit von Stronati et al. [16] wurde zwar das PAINT-Protokoll nach Tucker et al. [37] angewandt, jedoch wurde ebenfalls mit absoluten Aberrationszahlen gearbeitet und der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve unter diesem Aspekt durch den Nullpunkt ergibt bei einer bekannten Translokations-Hintergrundfrequenz einen erhöhten statistischen Fehler [16]. Lucas et al. [27] wertete nach einer ^{60}Co-Gammabestrahlung der Lymphozyten nur Translokationen des Chromosoms 1 aus, ohne sich auf das angeführte PAINT-Protokoll zu beziehen. Zusätzlich wurden ebenfalls Dosisbereiche gewählt, welche mit den, für die vorliegende Arbeit signifikanten Werten, nicht in Einklang zu bringen waren. Lindholm et al. [25] bestrahlte Lymphozyten mit Dosen kleiner 1 Gy einer ^{60}Co-Gammastrahlung und wertete Translokationen der Chromosomen 1, 2 und 4 aus. Da in der Studie ebenfalls das PAINT-Protokoll nach Tucker et al. [37] unberücksichtigt blieb, existiert für die vorliegende Arbeit keine sicher vergleichbare ^{60}Co-Dosis-Wirkungskurve.

Die Problematik der Anwendung verschiedener Whole-Chromosome-Paintings zur Identifikation von Translokationen unterschiedlicher Chromosomen kann mit der Lucas-Formel umgangen werden. Diese ermöglicht eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen über die Bestimmung der Translokationsfrequenz des gesamten Genoms, setzt jedoch voraus, dass die Häufigkeit der chromosomalen Aberrationen vom DNA-Gehalt der Chromosomen abhängt [12, 16]. Doch wird diese Voraussetzung von einigen Autoren bezweifelt, da einige Chromosomen mit einem hohen DNA-Gehalt experimentell weniger Aberrationen zeigten, als demnach zu erwarten gewesen wäre, so dass weitere Einflußfaktoren wie zum Beispiel die Gendichte und Lage der Chromosomen im Zell-

kern angenommen wurden [54, 55, 60]. Weiterhin sind auch bei der Anwendung der Lucas-Formel die unterschiedlichen Auswertekriterien der Translokationen zwischen den Laboren zu berücksichtigen, denn die dadurch ggf. erhaltenen unterschiedlichen Aberrationszahlen spiegeln sich im Ergebnis der ermittelten Translokationsfrequenz umgerechnet auf das Gesamtgenom wieder.

4.4 Relative biologische Wirksamkeit

Grundsätzlich gehört die Gamma- und Betastrahlung der low-LET Strahlung mit einer linear quadratischen Dosis-Wirkungsbeziehung ($Y = \alpha D + ß D^2$) an [5]. In der vorliegenden Arbeit wurde die ^{60}Co-Gammastrahlung als Referenzstrahlung gewählt. Fraglich ist, ob sich Chromosomenaberrationen durch den Betastrahler ^{90}Y induziert, an einer ^{60}Co-Gammastrahlung-Dosis-Wirkungskurve messen lassen können. Zunächst besteht bei einem einheitlichen Strahlungswichtungsfaktor von 1 für Beta- und Gammastrahlung kein Zweifel an der Vergleichbarkeit der Chromosomenschäden an der ^{60}Co-Dosis-Wirkungskurve. In der biologischen Dosimetrie sind häufig die Niedrigdosisbereiche relevant, in welchen sich jedoch die dünn ionisierenden Strahlungen in ihrer biologischen Wirkung unterscheiden [61]. Diese RBW drückt sich in den unterschiedlichen α-Koeffizienten aus [11, 15, 62]. Die hypothetische Annahme, dass die lineare Komponente α durch einen einzelnen Ionisationsprozess ausgelöst wurde und proportional zur Dosis und die quadratische Komponente β aus zwei unabhängigen Absorptionsereignissen an zwei unterschiedlichen Orten resultiert und proportional zum Quadrat der Dosis ist [11], würde bedeuten, dass Brüche durch den linearen Wert und Austauschvorgänge wie Translokationen durch den quadratischen Wert der linear quadratischen Dosis-Wirkungsbeziehung verkörpert werden [5]. Doch dominiert für die akute Strahlenexposition kleiner 0,4 Gy und für die Expositionen von geringen bis mäßigen Dosisraten, wie in der vorliegenden Arbeit angewandt, bei strahlungsinduzierten Translokationen der α-Koeffizient [17]. Diese Abweichung lässt sich durch eine höhere Energiedeposition, welche auch bei locker ionisierender Strahlung eintreten kann und zur Bildung von zwei Brüchen führt, erklären [4]. Zusätzlich haben neben den direkten auch die indirekten Strahlenwirkungen Einfluss auf die Aberrationsentstehung [2]. Weiterhin wirken sich Reparaturprozesse der Zelle auf den β-Term aus, denn insbesondere bei einer geringeren Dosisrate können diese innerhalb längerer Zeitintervalle zwischen dem ersten und dem zweiten Schadensereignis bei der low-LET Strahlung eine zunehmend linearere Dosis-Wirkungskurve insofern bedingen, dass der β-Term abnimmt [5]. Wie entscheidend in diesem Zusammenhang die Wahl der Referenzstrahlung ist, stellten Lucas et al. [17] heraus, denn der α-Koeffizient für die Röntgen-

strahlung war um den Faktor 2 bis 3 höher als für die ^{60}Co-Gammastrahlung und demnach muss die RBW der ^{60}Co-Gammastrahlung gegenüber der Röntgenstrahlung geringer sein und sollte in der biologischen Dosimetrie nicht unberücksichtigt bleiben. Entsprechend gaben Lloyd und Purrott [11] eine vergleichsweise geringe RBW für ^{60}Co-Gammastrahlung, verglichen mit 250 kV Röntgenstrahlung, von 0,3 bis 0,4 an. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit existierte keine Dosis-Wirkungskurve für ^{90}Y, jedoch für den Betastrahler Tritium, welcher eine geringere Betaenergie als ^{90}Y aufweist. Tritium hat im Vergleich zur Röntgen-Referenzstrahlung einen, um den Faktor 1,3 höheren α-Koeffizienten [63]. So lag die Vermutung nahe, dass auch der Betastrahler ^{90}Y einen höheren α-Koeffizienten aufweisen würde als die Röntgen- und dem zu Folge auch als die ^{60}Co-Gammastrahlung und demnach eine Überschätzung der Dosis zu erwarten wäre. Da ein höherer α-Koeffizient auch eine größere biologische Wirkung mit sich bringt, ist somit bei ^{90}Y ein tatsächlich größerer Strahlungswichtungsfaktor als bei der ^{60}Co-Gammastrahlung zu postulieren. Aufgrund der jedoch tatsächlich geringeren Dosis der Betastrahlung ist trotz des größeren Strahlungswichtungsfaktors ein Messen, der durch den Betastrahler ^{90}Y induzierten Chromosomenaberrationen, an der ^{60}Co-Dosis-Wirkungskurve möglich.

4.5 Chromosomenaberrationen nach RSO unter Berücksichtigung des Aktivitätsabtransportes

Bereits in der Vergangenheit wurden Chromosomenaberrationen und Strahlungsrisiken im Zusammenhang mit der Applikation von Radionukliden im Rahmen der RSO unter Berücksichtigung des lymphogenen Aktivitätsabtransportes untersucht [22, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51]. Chromosomenuntersuchungen sind, um einen möglicherweise verursachten biologischen Effekt durch die Radionuklidapplikation bei der RSO aufdecken zu können, zu den Zeitpunkten vor und nach der RSO-Therapie erforderlich. Diese Voraussetzung fand jedoch nicht in allen Studien Berücksichtigung [45, 49]. Im Fokus der Analysen nach der RSO-Therapie standen bisher dizentrische Chromosomen und Mikronuklei. Die in dieser Arbeit durchgeführte FISH zur Darstellung von Translokationen kam bisher in früheren Studien im Zusammenhang mit Chromosomenanalysen nach RSO-Therapien nicht zur Anwendung, daher ist die unmittelbare Vergleichbarkeit der gefundenen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit mit Ergebnissen früherer Erhebungen aufgrund der unterschiedlichen Methodik erschwert. In der Arbeit von Daker [47] wurden beispielsweise zur Auswertung instabiler, dizentrischer Chromosomenaberrationen Zellkulturen mit 48 und 72 Stunden Inkubationszeit zusammengefasst,

wodurch die Gewährleistung, Zellen in der ersten Mitose auszuwerten, nicht gegeben war. Die Ergebnisse der 10 Patienten mit einem signifikanten Aberrationsanstieg dizentrischer Chromosomen nach der RSO von insgesamt 23 beobachteten Patienten, sind durch das Fehlen einer Zellzykluskontrolle kritisch zu bewerten, anders bei der Auswertung von Translokationen als stabile Aberrationen, welche in der zweiten Mitose nicht verloren gehen.

In einigen Arbeiten wurden die Werte der einzelnen Patienten aufsummiert, auf das Gesamtkollektiv bezogen und als Nachweis signifikant erhöhter Chromosomenaberrationen, durch die RSO-Therapie bedingt, interpretiert [46, 48, 51]. Doyle et al. [48] fanden nach der RSO, bezogen auf das Gesamtkollektiv, eine statistisch signifikante Zunahme von Chromosomenaberrationen, jedoch hinsichtlich des Einzelpatienten wurde nur bei 9 von 30 Patienten eine Chromosomenaberrationszunahme ohne Signifikanzangabe ermittelt. Prosser et al. [50] beobachteten bei 6 von 21 mit ^{90}Y therapierten Patienten einen signifikanten Anstieg von Mikronuklei im Vergleich vor und nach RSO-Therapie, welcher bei 3 dieser Patienten im Zusammenhang mit einem lymphogenen Abtransport gesehen werden konnte, ohne jedoch einen signifikanten Anstieg von Mikronuklei im Gesamtkollektiv nachweisen zu können. In der vorliegenden Arbeit fand sich, bezogen auf das Gesamtkollektiv von 10 Patienten, ein signifikanter Anstieg der Translokationen von 0,0034 (0,34 %) Aberrationen pro Zelle vor der RSO auf 0,0051 (0,51 %) Aberrationen pro Zelle nach der RSO. Somit ist hinsichtlich des Gesamtkollektivs ein durch die RSO-Therapie bedingter, biologischer Effekt nachweisbar. Da bei den einzeln betrachteten 10 Patienten keinerlei signifikante Chromosomenaberrationszunahme festzustellen war, sind Rückschlüsse vom Gesamtkollektiv auf den Einzelpatienten nicht möglich.

Die Chromosomenaberrationszunahme wurde bisher in Abhängigkeit von einem lymphogenen Aktivitätsabtransport des Radionuklids und dem damit in Verbindung stehendem, möglichem Tumorrisiko kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Arbeit fand sich bei 3 der 10 Patienten ein Aktivitätsabtransport aus dem Kniegelenk bis zu maximal 4,8 %, entsprechend einer Aktivität von 10,5 MBq. Weder bei den 3 Patienten mit lymphogenem Abtransport, noch bei den weiteren 7 war eine signifikante Translokationszunahme im Vergleich vor und nach der RSO vorhanden. Somit ist bei einem Abtransport bis zu 4,8 % oder 10,5 MBq gemäß den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten, kein biologischer Effekt zu erwarten. Das entspricht den erhobenen Daten von Gumpel und Stevenson [49], welche eine erhöhte Anzahl von dizentrischen Chromosomenaberrationen nach einem lymphogenen Abtransport größer als 5 %

beobachteten, jedoch ohne die Schäden vor der RSO erfasst zu haben und ohne Angabe einer Aktivitätsmessung. Edmonds et al. [64] stellten bei 6 von 19 Patienten einen lymphogenen Abtransport in die regionären Lymphknoten von 0,4 bis 8,9 % fest. Von insgesamt 6 Patienten mit Nachweis eines erhöhten Mikronukleianstiegs nach der RSO-Therapie, wies nur einer einen lymphogenen Abtransport auf, welcher mit 3,6 % einer Aktivität von 6,66 MBq entsprach. Die Patienten mit einem deutlich höheren Aktivitätsabtransport mit bis zu 8,9 % hingegen, wiesen keine erhöhte Mikronukleianzahl nach der RSO auf. Hinsichtlich Mikronuklei ist die quantitative Relation zur Dosis ionisierender Strahlung jedoch weniger gut gesichert [5, 18] und könnte die von Edmonds et al. [64] gefundene Mikronukleizunahme bereits unterhalb eines Aktivitätsabtransportes von 4,8 % erklären. Voth et al. [22] konnten bei 9 von 10 Patienten keinen signifikanten Anstieg dizentrischer Chromosomenaberrationen im Vergleich vor und nach der RSO verzeichnen. Lediglich bei einem Patienten, welcher insgesamt zwei RSO-Therapien erhalten hatte, war mit einem lymphogenen Aktivitätsabtransport von 6 MBq eine signifikante Aberrationszunahme dizentrischer Chromosomen festzustellen. Anhand des nachgewiesenen Strahleneffektes durch die RSO konnte bei dem angeführten Patienten aufgrund der hohen Nachweisempfindlichkeit durch die Auswertung dizentrischer Chromosomen, eine sich im Niedrigdosisbereich bewegende Strahlendosis von 130 mGy pro Einzel-RSO ermittelt werden. Stevenson et al. [51] fanden bei 5 von 10 Patienten einen signifikanten Aktivitätsabtransport in die regionären Lymphknoten mit einem Anstieg dizentrischer Chromosomenaberrationen, jedoch ohne Angabe der Signifikanz der Aberrationszunahme. De La Chapelle et al. [45] verzeichneten keinen sicheren Zusammenhang zwischen der Strahlendosis inguinaler Lymphknoten und Chromosomenaberrationen. Sie kamen jedoch nach dem Vergleich zwischen einer Kontrollgruppe ohne RSO-Therapie und einer Patientengruppe nach RSO-Therapie mit und ohne Durchführung einer entsprechenden Gelenkruhigstellung zu dem Schluss, dass eine Gelenkimmobilisation nach der Therapie den biologischen Strahlenschaden reduzieren kann. Aberrationen der therapierten Patientengruppe vor der RSO-Behandlung wurden nicht ausgewertet. Ein unmittelbarer Rückschluss der Aberrationsentstehung durch die Therapie ist daher nicht möglich. Eine Gelenkruhigstellung nach Durchführung der RSO ist für den Aktivitätsabtransport von Bedeutung und sollte daher nicht unberücksichtigt bleiben. Dies wurde dennoch nicht in allen Studien umgesetzt [49, 51]. In der Arbeit von Klett et al. [65] war im Gesamtkollektiv bei 17 von 35 Patienten ein lymphogener Aktivitätsabtransport von maximal 4,78 % nachweisbar, welcher gemäß der angegebenen applizierten ^{90}Y-Aktivität von 200 MBq, 9,56 MBq entspräche und mit dem in der vorliegenden Arbeit ermittelten maximalen Aktivitätsab-

transport von 4,8 % und einer Aktivität von 10,5 MBq in Einklang zu bringen ist. Eine Auswertung von Chromosomenaberrationen fand in der Arbeit von Klett et al. [65] nicht statt. Gemäß den in der vorliegenden Studie erhobenen Daten, wäre eine Chromosomenaberrationszunahme bis zu diesem Wert bei keinem der 17 Patienten zu erwarten. Es ist in der vorliegenden Arbeit jedoch die geringe Fallzahl der Patienten mit einem Aktivitätsabtransport zu berücksichtigen, welche keinen sicheren Zusammenhang zwischen Aktivitätsabtransport und Chromosomenschäden herstellen lässt. Des Weiteren ist aufgrund der geringen zu untersuchenden Strahlendosen im Rahmen der RSO und der hohen Nachweisgrenze der Dosis-Wirkungskurve unter Auswertung von Translokationen als zytogenetische Endpunkte, eine exakte Dosisbestimmung nicht sicher möglich.

4.6 Biologische Dosimetrie

Die Intention zur Erstellung einer biologischen Dosimetrie ist die Strahlenexposition und das damit im Zusammenhang stehende Tumorrisiko durch eine Therapie, wie beispielsweise bei der RSO mit Applikation von Radionukliden, abschätzen und somit eine Nutzen-Risiko-Relation für den Patienten abwägen zu können. Entsprechend wurden auch in früheren Studien Berechnungen der erhaltenen Strahlendosen nach einer RSO-Therapie und unter Berücksichtigung des Abtransportes durchgeführt und Werte zwischen 0,255 Gy und 0,5 Gy ermittelt. Edmonds et al. [64] werteten für einen Patienten mit größter Mikronukleizunahme nach RSO und einem lymphogenen Aktivitätsabtransport in die regionären Lymphknoten mit 3,6 % (6,66 MBq) eine Dosis von 0,3 Gy aus. Ebenso gaben Prosser et al. [50] über eine Mikronukleierfassung eine maximale Strahlendosis für einen Einzelpatienten von 0,3 Gy an, welche anhand einer im selben Labor erstellten Dosis-Wirkungskurve mit 250 kV Röntgenstrahlung als Referenzstrahlung ermittelt wurde. Voth et al. [22] fanden für einen Patienten mit einem Abtransport von 3,4 % (6 MBq) bei einem signifikanten Anstieg von dizentrischen Chromosomen eine Dosis von 0,255 Gy bei zwei stattgehabten RSO. Doyle et al. [48] bezogen sich hingegen auf ein Gesamtkollektiv und beschrieben über eine Aberrationszunahme dizentrischer Chromosomen eine Dosis von 0,5 Gy. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen, nach oben abgeschätzten Dosiswerte nach RSO liegen zwischen 0,235 Gy und 0,468 Gy mit einer gemittelten Dosis von 0,32 Gy und lassen sich mit den bisher in der Literatur angegebenen Dosiswerten gut vereinbaren. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Translokationszunahme vor und nach der RSO-Therapie fand, aus deren Differenz die Dosis hätte berechnet werden können. Daher musste eine für die Signifikanz erforderliche Zunah-

me der Chromosomenschäden im Sinne einer Abschätzung nach oben ermittelt und anschließend die Dosis, die dieser berechneten Zunahme entsprach, zugeordnet werden. Folglich lagen die tatsächlich durch die RSO erhaltenen Dosen unter den rechnerisch ermittelten. Eine genaue Angabe der Dosis wird durch eine erhöhte Hintergrundfrequenz der Translokationen und eine hohe Inter-Donor-Variabilität erschwert. Die angegebene Hintergrundfrequenz von Translokationen variiert je nach Literaturangabe: Das Bundesamt für Strahlenschutz, Pressl et al. [26] gaben sie mit 0 bis 5,3 Translokationen pro 1000 Zellen an und Bauchinger [19] mit 0 bis 4 auf 1000 Zellen. Im Gegensatz dazu wiesen die dizentrischen Chromosomen eine Hintergrundfrequenz von nur 0 bis 1 auf 1000 Zellen auf. Während Lucas et al. [17] eine Hintergrundfrequenz von einem Spender von 0,005 Translokationen pro Zelle ermittelten, wurde die Hintergrundfrequenz von Lucas et al. [66] von ebenfalls nur einem Spender von 0,0033 Translokationen pro Zelle angegeben und Stronati et al. [16] fanden bei vier gesunden Spendern eine durchschnittliche Hintergrundfrequenz von 0,012 Translokationen pro Zelle. In allen drei Studien wurden die Chromosomen 1, 2 und 4 gemarkert und bei Lucas et al. [17, 66] zusätzlich die Zentromere. Eine Zentromerdarstellung führten auch Finnon et al. [20] mit Darstellung der Chromosomen 2, 3 und 5 durch und ermittelten eine Hintergrundfrequenz von einem Spender von 0,0035 Translokationen pro Zelle. Das PAINT-Protokoll nach Tucker et al. [37] wandten von den angeführten Arbeiten jedoch nur Stronati et al. [16] und Finnon et al. [20] an. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Hintergrundfrequenz erstreckt sich über eine Breite von 0 bis 12 Translokationen auf 1000 Zellen und unterstreicht neben der erhöhten Hintergrundfrequenz von Translokationen im Gegensatz zu den dizentrischen Chromosomen auch die hohe interindividuelle Variabilität. Die erhobenen Daten der vorliegenden Arbeit sind bei übereinstimmender Auswertemethodik (PAINT-Protokoll nach Tucker et al. von 1995 [37]) und unter Berücksichtigung von nur insgesamt zwei gemarkerten Chromosomen (Chromosom 1 und 2) mit den von Stronati et al. [16] angegebenen Daten vergleichbar. Ursächlich für eine erhöhte Hintergrundfrequenz von Translokationen wird vorrangig das Lebensalter angegeben, da Translokationen als stabile Chromosomenaberrationen über die Lebensspanne und somit über das Alter zunehmen [24]. Entsprechend betrug das Alter des Patienten mit der minimalen Hintergrundfrequenz in unserer Erhebung 47 Jahre und des Patienten mit der maximalen Hintergrundfrequenz 71 Jahre. Auffallend war bei Stronati et al. [16] die hohe Translokationsfrequenz bei deutlich geringerem Lebensalter der Spender (25 bis 40 Jahre). Gepoolte Daten unterschiedlicher Labore könnten bei Stronati et al. [16] das Ergebnis beeinflusst haben. Die geringere Hinter-

grundfrequenz von Finnon et al. [20] entsprach den erwarteten in Anbetracht des deutlich jüngeren, 29-jährigen Spenders.

Die Problematik, die sich aus der erhöhten Hintergrundfrequenz der Translokationen entwickelt, ist eine geringere Sensitivität der Methodik und somit eine erhöhte Nachweisgrenze für die biologische Dosimetrie, welche je nach Literatur zwischen 0,3 Gy [16] bis 0,5 Gy [25, 26] angegeben wird. Entsprechend fand sich in der vorliegenden Arbeit bei einer hohen Hintergrundfrequenz des Spenders von 5 eine untere Nachweisgrenze von 0,535 Gy, ab welcher eine signifikante Chromosomenaberrationszunahme zu verzeichnen war und ab welcher somit verlässliche Dosisberechnungen möglich sind. Unter optimalen Bedingungen wäre bei keiner nachweisbaren Translokation der Spenderzellen vor Bestrahlung und einer für die Signifikanz erforderliche Aberrationszunahme von 5 Translokationen, eine bestmögliche untere Nachweisgrenze von 0,235 Gy zu erwarten. Um auch zuverlässige Werte im Niedrigdosisbereich kleiner 0,5 Gy erhalten zu können, ist jedoch eine Auswertung größerer Zellzahlen erforderlich [19, 59]. Finnon et al. [20] erklärten, dass für dieselbe Aussagekraft von 500 konventionell gefärbte Zellen (z. B. Giemsa) 1500 FISH gefärbte Zellen auszuwerten wären. Dem entsprechend fand sich in der Publikation von Lucas et al. [17] auch im Niedrigdosisbereich unterhalb von 0,2 Gy eine linear quadratische Dosis-Wirkungsbeziehung ($Y = 0{,}005 + 0{,}023\ D + 0{,}053\ D^2$) unter Auswertung von mehr als 39000 Zellen. In der vorliegenden Arbeit war die Auswertung von 1000 Zellen pro Dosispunkt nicht ausreichend genug, um auch in niedrigeren Dosisbereichen noch verlässliche Daten zu erhalten. Nicht zu vernachlässigen ist der erhöhte Kosten- und Arbeitsaufwand, welcher die FISH-Technik bei Auswertung großer Zellzahlen mit sich bringt [5].

Regulär wird zum Nachweis von Translokationen in der biologischen Dosimetrie ein Drei-Farben-FISH durchgeführt, welcher je nach Auswahl der Chromosomen ungefähr 20 % des Gesamtgenoms entspricht. In unserer Arbeit wurden nur zwei Chromosomen, entsprechend 16,2 % des Gesamtgenoms ausgewertet und vermindert somit die Sensitivität, denn je größer der Anteil der gemarkerten Chromosomen am Gesamtgenom, desto höher ist die Sensitivität. Die Anwendung eines Mehrfarben-FISH mit Painting von ggf. mehr als drei Chromosomen kann daher die Sensitivität erhöhen, obwohl die Nachweisgrenze von Translokationen aufgrund ihrer hohen Hintergrundfrequenz dennoch über der von dizentrischen Chromosomen liegen wird [15].

Durch unterschiedliche Strahlenempfindlichkeiten zwischen den Spendern können bei der biologischen Dosimetrie Unsicherheiten auftreten. In früheren Arbeiten wurde dies

jedoch kontrovers diskutiert. Lucas et al. [17] fanden keine signifikanten Unterschiede in der Radiosensitivität und auch Stronati et al. [16] beschrieben keine statistische Signifikanz diesbezüglicher interindividueller Unterschiede. Bei beiden wurden durch eine ^{60}Co-Quelle induzierte Translokationen ausgewertet. Hingegen diskutierten Lloyd und Purrott [11], Lloyd et al. [58] und Bauchinger [19] durchaus unterschiedliche Strahlenempfindlichkeiten zwischen einzelnen Spendern, doch nur Bauchinger [19] bezieht sich auf Translokationen, während Lloyd et al. [58] und Lloyd und Purrott [11] sich vorwiegend auf dizentrische Chromosomenaberrationen konzentrierten.

Eine erhöhte interindividuelle Variabilität stabiler Chromosomenaberrationen wie Translokationen lässt sich auf die Akkumulation der Aberrationen über die Lebensspanne zurückführen. Stabile Chromosomenaberrationen werden daher zur „life-time-dose-reconstruction“ [17, 25] und begründen somit eine von Lindholm et al. [25] beschriebene 10-fach höhere Spontanrate von Translokationen im Gegensatz zu den dizentrischen Chromosomenaberrationen. Pressl et al. [23] berichteten in Abhängigkeit vom Alter über eine konstante spontane Aberrationsrate bis zum 40. Lebensjahr und einen Anstieg um den Faktor 2 in den folgenden Lebensjahren bis 50 und einen weiteren Anstieg in den folgenden Altersgruppen. Neben dem Alter des Patienten soll die spontane Translokationsrate auch von Rauchgewohnheiten und vom Geschlecht abhängig sein [23, 24]. In der Literatur wird unter Berücksichtigung dieser Aspekte die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve auf Basis der Auswertung von mindestens 3 unterschiedlichen Spendern angeraten [28]. In der vorliegenden Arbeit basiert die Dosis-Wirkungskurve auf nur einem gesunden, weiblichen, 29-jährigen Spender. Das Patientenkollektiv selbst bestand aus 3 männlichen und 7 weiblichen Spendern unterschiedlichen Alters. Aufgrund der angeführten erhöhten Hintergrundfrequenzen und der auch an dem Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit festgestellten, interindividuellen Variabilität, sind Unsicherheiten möglich. Durch Ermittlung und Anwendung von Translokationsdifferenzen konnten diese Unsicherheiten minimiert werden. Dennoch ist die Erstellung einer jeweils neuen Dosis-Wirkungskurve für unterschiedliche Altersklassen und getrennt für jedes Geschlecht in Erwägung zu ziehen.

Die maximale Reichweite von ^{90}Y beträgt 11 mm und ist damit bei der RSO des Kniegelenkes nahezu ausschließlich auf dieses beschränkt, es sei denn, es erfolgt ein lymphogener Aktivitätsabtransport, im Rahmen dessen es zu einer Anreicherung der Aktivität in die Lymphknoten und ggf. auch in die Milz und in das Knochenmark kommen kann. Die biologischen Effekte, welche im Rahmen der RSO des Kniegelenkes in früheren Arbeiten beschrieben wurden, wurden auf das Passieren der Lymphozyten

durch das Kniegelenk oder durch die Lymphknoten, wenn ein lymphogener Abtransport erfolgte, zurückgeführt [45, 51]. So handelt es sich in der vorliegenden Arbeit um die Untersuchung einer Teilkörperbestrahlung des lymphatischen Systems, speziell der Lymphozyten und nicht um eine Ganzkörperbestrahlung [49, 51, 67]. Bei einer Teilkörperbestrahlung kann es zum so genannten Verdünnungseffekt durch Vermischen von geschädigten, bestrahlten und ungeschädigten, unbestrahlten Lymphozyten kommen, welcher zu einem Selektionsnachteil der bestrahlten Zellen in Form eines mitotic delay oder eines Interphasetodes bzw. einer Apoptose führen kann [11]. Nach 48 Stunden Standardkulturzeit könnte daher die erste Mitose der geschädigten Zellen nach entsprechender Stimulation mit beispielsweise PHA noch nicht abgeschlossen sein und die Zellen würden somit der Analyse entgehen. Die Zellzyklusverzögerungen sind abhängig vom LET, Art und Anzahl der Aberrationen sowie dosisabhängig, so besteht der Selektionsvorteil der unbestrahlten Zellen in der Menge des bestrahlten Zellvolumens und dessen erhaltener Dosis. In früheren Arbeiten wurden die Untersuchungen von Zellzyklusverzögerungen mit relativ hohen Dosen von 1 bis 4 Gy Röntgenstrahlung durchgeführt [68, 69, 70]. Die Problematik des mitotic delay soll mit dem Verfahren der Premature-Chromosome-Condensation (PCC) umgangen werden, indem eine frühzeitige Chromosomendarstellung durch eine vorzeitige Chromosomenkondensation, ohne dass eine Zellteilung abgewartet werden muss, erfolgt und stark geschädigte Zellen, welche häufig keine Zellteilung vollziehen, dennoch in die Auswertung mit eingehen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Anwendung von PCC nur in hohen Dosisbereichen erforderlich ist [16]. Auch Lloyd et al. [69] berichteten über eine Relevanz von Zellzyklusverzögerungen in eher höheren Dosisbereichen von 1,5 bis 4 Gy und hielten an der Standardkulturzeit von 48 Stunden fest. Bolus [2] gab Zellzyklusverzögerungen erst ab einer Dosis größer 0,5 Gy an. Da sich das Patientenkollektiv in der vorliegenden Arbeit in einem geringeren Dosisbereich kleiner 0,5 Gy bewegt, sind signifikante Zellzyklusverzögerungen nicht zu erwarten. Auch kann das Risiko von Zellzyklusverzögerungen, verbunden mit einer Gefahr der Unterschätzung des Strahlenrisikos, aufgrund der Anwendung der low-LET Strahlung ^{60}Co und ^{90}Y als eher gering erachtet werden.

Häufiger noch als die Zellzyklusverzögerungen soll im Rahmen des Selektionsnachteils bestrahlter Zellkulturen der ebenfalls dosisabhängige Interphasetod auftreten [11, 69]. In der Vergangenheit wurde daher auch die Apoptosemessung zur Erfassung strahleninduzierter DNA-Schäden durch Registrierung des programmierten Zelltods und ihre Anwendbarkeit in der biologischen Dosimetrie diskutiert [30]. Wenn die biologische

Dosimetrie durch einen direkten Nachweis von Chromosomenaberrationen zum Beispiel in Form von Translokationen unter Anwendung der FISH-Technik erfolgt, könnten strahlungsinduzierte Apoptosen zu einer Unterschätzung des Strahlenschadens führen, insbesondere dann, wenn eine Blutentnahme erst einige Zeit nach der Strahlenexposition entnommen wurde [11], denn insbesondere die zirkulierenden, sich in der Ruhephase G0 befindlichen Lymphozyten, welche zum Beispiel durch Strahlung geschädigt wurden, unterliegen in vivo der Apoptose in einem stärkeren Ausmaß, als die bestrahlten und anschließend mittels PHA stimulierten Lymphozyten in vitro [71]. In der Vergangenheit wurde aufgrund der Komplexibilität versucht, durch eine Kultur von bestrahlten und unbestrahlten Zellen, eine Teilkörperbestrahlung in vitro zu simulieren [68, 70, 72, 73, 74]. Hierzu wurden Röntgenstrahlungen mit unterschiedlichen Dosis-Leistungen, je nach Literaturquelle in Dosen zwischen 0,5 bis maximal 5 Gy angewandt und gemischte Zellkulturen mit bestrahltem und unbestrahltem Blut angelegt. Guerrero-Carbajal et al. [73] zeigten einen Abfall von Translokationen nach einer simulierten Teilkörperbestrahlung mit 4 Gy einer 250 kV Röntgenstrahlung im Vergleich zu einer Ganzkörperbestrahlung auf und führten die mögliche Unterschätzung der Dosis auf den Anteil der bestrahlten Zellfraktion zurück. Auch Poncelet et al. [70], welche mit 2 und 4 Gy einer 250 kV Röntgenstrahlung arbeiteten, zeigten eine Diskrepanz in Form einer Minderung der beobachteten Chromosomenaberrationen gegenüber den erwarteten und folgerten aus den Daten bezüglich einer Teilkörperbestrahlung ebenfalls eine mögliche Unterschätzung der erhaltenen Strahlendosen bzw. eine Unterschätzung des exponierten Körperanteils und beschrieben zusätzlich eine Dosisabhängigkeit. Fabry et al. [75] sahen in Abhängigkeit vom bestrahlten Zellvolumen, insbesondere in hohen Dosisbereichen unter Anwendung von 1 bis 10 Gy einer ^{60}Co-Gammastrahlung, ebenfalls diese Problematik. Diesen Ergebnissen schlossen sich auch Hoffmann et al. [68] nach Experimenten mit Dosen zwischen 1 und 5 Gy einer 200 kV Röntgenstrahlung an. Lloyd et al. [74] simulierten eine Teilkörperbestrahlung mit Dosen zwischen 0,5 bis 7 Gy einer 250 kV Röntgenstrahlung und kamen zu dem Ergebnis, dass durch die rasche Zirkulation der Lymphozyten auch beim Vorliegen einer Teilkörperbestrahlung eine Uniformität eintritt, obwohl zusätzlich die Problematiken der Apoptose und der Zellzyklusverzögerungen eingeräumt wurden. In Dosisbereichen kleiner 0,5 Gy fand sich hinsichtlich überlebender und die Mitose eingehender Zellen nur eine geringfügige Differenz zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Zu berücksichtigen ist die im Vordergrund stehende Dosisabhängigkeit der beschriebenen Effekte, welche zur Unterschätzung der Strahlendosis führen könnte. Frühere Arbeiten, welche eine Unterschätzung der Strahlendosis durch eine simulierte Teilkörperbestrahlung beschrieben,

wurden mit Dosen zwischen 1 und 5 Gy durchgeführt und lagen damit höher, als die in der vorliegenden Arbeit ermittelten maximalen Dosen des Patientenkollektivs mit kleiner 0,5 Gy. In Anlehnung an die Ergebnisse von Lloyd et al. [74] waren diese Effekte in unserer Arbeit vernachlässigbar. Hinsichtlich der praktischen Umsetzung einer Berücksichtigung der Teilkörperbestrahlung in der biologischen Dosimetrie kann die Abschätzung des Mischungsverhältnisses von bestrahlten und unbestrahlten Zellen jedoch nicht exakt erfolgen. Einer möglichen Unterschätzung der Strahlendosis wurde in der vorliegenden Arbeit bei nicht signifikantem Chromosomenaberrationsanstieg nach der RSO-Therapie bereits durch eine Abschätzung der Dosis nach oben entgegengesteuert.

4.7 Schlussfolgerungen

Die erstellte Dosis-Wirkungskurve mit Translokationen als zytogenetische Endpunkte lässt unter Annahme einer optimalen Hintergrundfrequenz von 0 Translokationen und mit einer, für eine Signifikanz notwendige Aberrationszunahme von 5, eine idealisierte Nachweisgrenze von 234,5 mGy erwarten. Auch ungeachtet der tatsächlich ermittelten Nachweisgrenze von 535 mGy liegen somit, bei einer maximalen Aberrationsdifferenz von einmalig 5 und einmalig 6 Translokationen innerhalb des Patientenkollektivs, auch unter optimalen Bedingungen, die applizierten Strahlendosen bestenfalls im Grenzbereich, jedoch überwiegend unterhalb der bestmöglichen Nachweisgrenze.

Ein signifikanter Anstieg von lymphozytären Chromosomenschäden im Vergleich vor und 28 Tage nach Durchführung der RSO fand sich bei keinem der Patienten des betrachteten Patientenkollektivs.

Die daraufhin geschätzten Dosiswerte lagen trotz einer Korrektur nach oben unterhalb der Nachweisgrenze der Dosis-Wirkungskurve. Daher ist die erstellte Dosis-Wirkungskurve mit Translokationen als zytogenetische Endpunkte für die Durchführung einer biologischen Dosimetrie im Niedrigdosisbereich, wie bei dem Anwendungsbeispiel der RSO aufgezeigt, nicht geeignet. Hier ist aufgrund einer deutlich geringeren Nachweisgrenze den dizentrischen Chromosomenaberrationen statt den mit FISH dargestellten Translokationen den Vorzug zu geben. Für nuklearmedizinische Therapieverfahren im Hochdosisbereich, wie beispielsweise bei der Radiojodtherapie von Schilddrüsenkarzinomen, ist die in dieser Arbeit neu erstellte Dosis-Wirkungskurve zur Durchführung einer biologischen Dosimetrie jedoch anwendbar.

Bezugnehmend auf das Gesamtkollektiv war ein signifikanter Anstieg der lymphozytären Chromosomenschäden im Vergleich vor und 28 Tage nach Durchfüh-

rung der RSO nachzuweisen. Ein Rückschluss vom Gesamtkollektiv auf den Einzelpatienten ist jedoch nicht möglich.

Ein fehlender signifikanter Anstieg von Chromosomenaberrationen bis zu einer applizierten Aktivität von 237 MBq schloss auch die Einzelpatienten mit ein, bei denen ein Aktivitätsabtransport dokumentiert werden konnte. Aufgrund der geringen Fallzahlen sind jedoch Aussagen hinsichtlich eines Zusammenhanges von Chromosomenaberrationen und Abtransport nicht sicher möglich.

5 Zusammenfassung

Die Intention der vorliegenden Arbeit war die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve zur abteilungsinternen Durchführung einer biologischen Dosimetrie nach Radionuklidanwendungen an Patientenkollektiven des Fachbereichs Nuklearmedizin. Unter Anwendung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) standen Translokationen als stabile Chromosomenaberrationen im Fokus der Analysen.

Bisher lagen keine standardisierten Dosis-Wirkungskurven mit Translokationen als zytogenetische Endpunkte vor. Aufgrund einer Inter-Labor-Variabilität bei der Erstellung von Dosis-Wirkungskurven, sollte jedes Labor seine eigene Kurve anfertigen. Hierzu wurden periphere Blutlymphozyten eines gesunden Spenders mit einer ^{60}Co-Quelle (Dosis-Leistung von 0,14 Gy/min) im Dosisbereich von 223 bis 1033 mGy bestrahlt und mittels FISH darstellbare Translokationen nach dem PAINT-Protokoll von Tucker et al. von 1995 [37] quantitativ erfasst. Es wurden 1000 Zellen je Dosispunkt und zusätzlich 1000 Zellen einer unbestrahlten Kontrollprobe ausgewertet. Der Translokationszuwachs wurde anschließend gegen die Dosis aufgetragen. Es lag eine linear quadratische Dosis-Wirkungskurve mit der Gleichung $Y = -0{,}00027 + 0{,}011\ D + 0{,}026\ D^2$ vor. Ab einer Dosis von 535 mGy fand sich ein signifikanter Aberrationszuwachs um 14 Translokationen und ist somit als Nachweisgrenze definiert. Die Hintergrundfrequenz wurde mit 5 auf 1000 Zellen bestimmt. Bei einer optimalen Hintergrundfrequenz von 0 auf 1000 Zellen wäre die bestmögliche Nachweisgrenze 234,5 mGy.

Um die Anwendbarkeit der Dosis-Wirkungskurve zu prüfen, wurde das Anwendungsbeispiel der Radiosynoviorthese (RSO) des Kniegelenkes mit ^{90}Y aufgrund der Besonderheit des lymphogenen Aktivitätsabtransportes gewählt. ^{90}Y gilt in diesem Zusammenhang als das am häufigsten angewandte Radionuklid mit der größten Reichweite und Energie. In der Literatur wurden bereits durch die RSO bedingte Chromosomenaberrationen beschrieben. Es existierte bisher im Zusammenhang mit der RSO jedoch keine biologische Dosimetrie mit Translokationen als zytogenetische Endpunkte.

Trotz eines einheitlichen Strahlungswichtungsfaktors der Beta- und Gammastrahlung von 1 können sich die relativen biologischen Wirksamkeiten dünn ionisierender Strahlungen unterscheiden. Dennoch ließen sich Chromosomenaberrationen durch einen Betastrahler induziert, an einer ^{60}Co-Gammastrahlung-Dosis-Wirkungskurve messen, denn nach Prüfung der α-Koeffizienten linear quadratischer Dosis-Wirkungskurven von Beta- und Gammastrahlern, als Indikator für ihre relative biologische Wirksamkeit, war in der vorliegenden Arbeit eher eine Überschätzung der Strahlendosis zu erwarten.

Es erhielten 10 Patienten im Alter zwischen 47 und 83 Jahren (Median 73,5 Jahre), davon 9 Patienten mit aktivierter Gonarthrose als Grunderkrankung und 1 Patient mit einer Oligoarthritis, eine RSO des Kniegelenkes mit ^{90}Y. Die intraartikulär applizierte Aktivität betrug zwischen 218 und 237 MBq (Mittelwert 227,8 MBq). Die Immobilisation des Kniegelenkes über 3 Tage nach der RSO wurde durch eine dorsale Gipsschiene gewährleistet. Am 3. Tag nach der RSO wurde der Aktivitätsabtransport aus dem Kniegelenk mittels Ganzkörperszintigraphie unter Ausnutzung der Bremsstrahlung des Betastrahlers ^{90}Y mit der Gammakamera erfasst und der prozentuale Anteil des Aktivitätsabtransportes bestimmt.

Unmittelbar vor und 28 Tage nach der RSO erfolgte die Untersuchung peripherer Blutlymphozyten auf Chromosomenaberrationen unter gleichen Bedingungen wie bei der Erstellung der Dosis-Wirkungskurve. Eine Zunahme der Chromosomenschäden wurde dann als nicht zufällig angesehen, wenn sie sich vor und nach der RSO mittels Vorzeichentest auf dem 5 % Niveau signifikant unterschieden. Bei keinem der 10 Patienten fand sich eine signifikante Aberrationszunahme nach der RSO. Daher musste der für die Signifikanz erforderliche Aberrationszuwachs nach dem Vorzeichentest ermittelt und die Dosis mit einer Abschätzung nach oben berechnet werden. Daraufhin wurden Strahlendosen zwischen 234,5 mGy und 467,8 mGy (Mittelwert 320 mGy) für den Einzelpatienten bestimmt, welche oberhalb der durch die Therapie tatsächlich erhaltenen Dosen lagen. Bei 3 von 10 Patienten zeigte sich ein Aktivitätsabtransport bis maximal 4,8 % (10,5 MBq). Bei keinem der 3 Patienten fand sich ein signifikanter Chromosomenaberrationsanstieg, so dass bis zu einem Abtransport von 4,8 % (10,5 MBq) kein biologischer Effekt zu erwarten wäre, jedoch ist in dieser Schlussfolgerung die geringe Fallzahl mit einzubeziehen.

Die nach Durchführung der RSO ermittelten Chromosomenaberrationen der peripheren Blutlymphozyten sind neben dem lymphogenen Aktivitätsabtransport auch auf das Passieren der Zellen durch das Kniegelenk zurückzuführen. Liegt kein Aktivitätsabtransport vor, so ist ^{90}Y mit einer maximalen Reichweite von 11 mm bei einer intraartikulären Injektion in das Kniegelenk ausschließlich auf dieses beschränkt. Zusammengenommen handelt es sich daher um eine Teilkörperbestrahlung. Der hierbei zu berücksichtigende Verdünnungseffekt mit einem durch Apoptose und Zellzyklusverzögerungen entstehendem Selektionsnachteil der bestrahlten Zellen mit der Gefahr einer möglichen Unterschätzung des Strahlenschadens, konnte in der vorliegenden Arbeit aufgrund des niedrigen Dosisbereiches und unter Beachtung der low-LET Strahlung vernachlässigt werden.

Die Sensitivität für eine biologische Dosimetrie mit Translokationen als zytogenetische Endpunkte war für den Fachbereich Nuklearmedizin aufgrund der interindividuellen Variabilität der Translokationen und aufgrund der hohen Hintergrundfrequenz mit der daraus resultierenden hohen Nachweisgrenze für das Anwendungsbeispiel der RSO nicht ausreichend. Da die instabilen dizentrischen Chromosomen hinsichtlich ihrer Reduktion über die Zeit für ein Zeitintervall von 28 Tagen nach einer Strahlenexposition als unkritisch anzusehen sind, sind insbesondere im Hinblick auf Niedrigdosisbereiche wie bei der RSO, die dizentrischen Chromosomenaberrationen zu Gunsten der Nachweisgrenze den Translokationen vorzuziehen. In höheren Dosisbereichen wie beispielsweise bei der Radiojodtherapie von Schilddrüsenkarzinomen, kann die erstellte Dosis-Wirkungskurve jedoch Anwendung finden.

Zur retrospektiven Dosisermittlung existierten bisher keine standardisierten Dosis-Wirkungskurven mit Translokationen als zytogenetische Endpunkte. Daher ist die vorliegende Arbeit auch ein weiterer Ansatz im Sinne einer Erfassung lang zurückliegender, kumulativer oder chronischer Strahlenexpositionen. Eine hohe Inter-Donor-Variabilität zwischen minimal 0 und maximal 12 Aberrationen auf 1000 Zellen und eine insgesamt erhöhte Hintergrundfrequenz konnten auf das Lebensalter der Patienten zurückgeführt werden, und die Erstellung von Dosis-Wirkungskurven mit Translokationen für die retrospektive Dosimetrie für unterschiedliche Altersgruppen erscheint sinnvoll.

6 Summary

The intention of the present study was to elaborate a dose response curve in order to carry out an intra-departmental biological dosimetry in view of radionuclide treatments of patient collectives of the Department of Nuclear Medicine. The focus of the analyses was on translocations as stable chromosome aberrations, making use of the Fluorescence in situ Hybridisation (FISH).

Hitherto, no standardised dose response curves with translocations as cytogenetic endpoints have been on hand. Due to an inter-laboratory variability when setting up dose response curves, each laboratory should elaborate its own curve. For this purpose, peripheral blood lymphocytes from a healthy donor with a ^{60}Co-source (dose rate of 0.14 Gy/min) were irradiated in a dose range from 223 to 1033 mGy and measured quantitatively by means of translocations presentable in FISH according to the PAINT-Protocol by Tucker et al. of 1995 [37]. The evaluation included 1000 cells per dose point and additionally 1000 cells of a non-irradiated control sample. Afterwards, the translocation increase was applied against the dose. There was a linear-quadratic dose response curve with the equation $Y = -0.00027 + 0.011\ D + 0.026\ D^2$. Starting from a dose of 535 mGy there was a significant aberration increase by 14 translocations and is consequently defined as detection limit. The background frequency was determined with 5 in 1000 cells. At an optimal background frequency from 0 to 1000 cells, the best possible detection limit would be 235.5 mGy.

In order to check the applicability of the dose response curve, the example of application of the radiosynoviorthesis (RSO) of the knee joint was selected with ^{90}Y due to the characteristic of the lymphogenous activity leakage. In this connection, ^{90}Y is considered to be the most commonly applied radionuclide with the largest range and energy. Chromosome aberrations due to the RSO have already been described in literature. However, until now there did not exist a biological dosimetry with translocations as cytogenetic endpoints in connection with the RSO.

In spite of a uniform radiation weighting factor of beta and gamma radiation of 1, the relative biological effectiveness of sparsely ionizing radiations can be distinguished. Notwithstanding, it was possible to measure chromosome aberrations, induced by a beta emitter, at a ^{60}Co-gamma radiation dose response curve, because it was more likely to expect in the present study an overassessment of the radiation dose after the examination of the α-coefficients of linear-quadratic dose response curves of beta and gamma emitters as an indicator of their relative biological effectiveness.

10 patients aged between 47 and 83 years (median 73.5 years), 9 of the patients with active gonarthrosis as underlying disease and 1 patient with oligoarthritis, received an RSO of the knee joint with ^{90}Y. The intra-articularly applied activity was between 218 and 237 MBq (average 227.8 MBq). The immobilisation of the knee joint during 3 days after the RSO was guaranteed by using a dorsal plaster splint. On the third day after the RSO, the activity leakage from the knee joint was captured by the gamma camera by means of a whole-body scintigraphy, using the braking radiation of the beta emitter ^{90}Y and the percentage of the activity leakage was determined.

Immediately before and 28 days after the RSO, peripheral blood lymphocytes were tested for chromosome aberrations under the same conditions applied during the elaboration of the dose response curve. An increase of chromosome damages was not been considered to be accidental in case they distinguish significantly on the 5 % level before and after the RSO by means of sample sign test. None of the 10 patients showed a significant aberration increase after the RSO. Consequently, the aberration increase necessary to define the significance had to be ascertained after the sample sign test and an upward calculation of the dose had to be made by estimation. Thereupon, radiation doses between 276.4 mGy and 467.8 mGy (average 320 mGy) were determined for the individual patient, which were above the doses actually obtained by the therapy. 3 of 10 patients showed an activity leakage up to a maximum of 4.8 % (10.5 MBq). None of the 3 patients showed a significant increase in chromosome aberration, so that no biological effect had to be expected up to a leakage of 4.8 % (10.5 MBq); however, the low number of cases has to be taken into account when considering this conclusion.

The chromosome aberrations of the peripheral blood lymphocytes determined after realising the RSO have to be attributed – in addition to the lymphogenous activity leakage – to the passage of the cells through the knee joint. If there is no activity leakage, the ^{90}Y with a maximum range of 11 mm receiving an intra-articular injection into the knee joint is exclusively limited to this. All in all, it is therefore a partial body irradiation. When carrying out the present study it was not necessary to consider the effect of dilution to be taken into account, with a selective disadvantage of the radiated cells arising from apoptosis and cell cycle delays, bearing the danger of a possible underestimation of the radiation damage, due to the modest dose range and observing the low-LET radiation.

The sensitivity for a biological dosimetry with translocations as cytogenetic endpoints was not sufficient for the Department of Nuclear Medicine due to the inter-individual

variability of the translocations and due to the high background frequency with a consequently high detection limit in view of the example of application of the RSO. Due to the fact that the instable dicentric chromosomes can be regarded as non-critical in view of their reduction over the time of a time interval of 28 days after a radiation exposure, the dicentric chromosome aberrations are to be preferred in favour of the detection limit of the translocations, particularly with regard to low dose ranges like in case of the RSO. However, in higher dose ranges like, for example, in case of the radioiodine therapy of thyroid carcinomas, the created dose response curve can be applied.

By now, there are no standardised dose response curves with translocations as cytogenetic endpoints to carry out a retrospective dose determination. Therefore, the present study represents another approach in the sense of an ascertainment of cumulative or chronic radiation exposure of the past. It was possible to attribute to the age of the patients an elevated inter-donor variability between a minimum of 0 and a maximum of 12 aberrations in 1000 cells and an all-in-all increased background frequency, and the elaboration of dose response curves with translocations for the retrospective dosimetry to be applied to different age groups seems to be reasonable.

7 Abkürzungsverzeichnis

AMCA	7-Amino-4-methylcumarin-3-essigsäure
Bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2`-desoxyuridin
^{60}Co	Koblat-60
DAPI	4`,6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
^{169}Er	Erbium-169
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
G	Gap
HCL	Chlorwasserstoffsäure, Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HR	homologe Rekombination
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
ISH	in-situ-Hybridisierung
kbp	Kilobasenpaare
KCL	Kaliumchlorid
LET	linearer Energietransfer
Mbp	Megabasenpaare
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogenkarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NHEJ	non-homologous end-joining
O_2	Sauerstoff

PAINT	Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCC	Premature-Chromosome-Condensation
PHA	Phytohämagglutinin
RBW	relative biologische Wirksamkeit
^{186}Re	Rhenium-186
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region-of-interest
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSO	Radiosynoviorthese
S	Synthese
SCA	Schwesterchromatidaustausch
SSC	Standard-Saline-Citrat
UpM	Umdrehungen pro Minute
^{90}Y	Yttrium-90
^{90}Zr	Zirkonium-90

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Nicht reziproke Translokation von Chromosom 2 (rot markiert) mit DAPI gefärbtem unbekannten Chromosom (t(Ab)). 10

Abbildung 2.1: Chromosomenaberration zwischen Chromosom 1 (grün markiert) und Chromosom 2 (rot markiert). Es resultiert ein dizentrisches Chromosom (dic(BC)) und ein zweifarbiges Fragment (ace(bc)). 20

Abbildung 2.2: Auswertung der Ganzkörperszintigraphie der Bremsstrahlung mit 1: Kniegelenk-ROI; 2: Lymphknoten-ROI; 3: Leber-ROI; B: Hintergrund-ROI 23

Abbildung 3.1: ^{60}Co-Dosis-Wirkungskurve 26

Abbildung 3.2: Kurve für die Berechnung der Dosis aus der Zunahme der Chromosomenschäden pro Zelle. 27

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Ermittelte Parameter zur Erstellung der ^{60}Co-Dosis-Wirkungs-kurve. 25

Tabelle 3.2: Patientenbezogene Daten der biologischen Dosimetrie. 28

Tabelle 3.3: Aktivitätsabtransportwerte des Patientenkollektivs. 29

10 Literaturverzeichnis

[**1**] Nekolla E.: Häufigkeit und Dosis röntgendiagnostischer und nuklearmedizinischer Untersuchungen. In: *BfS aktuell* 8 (2005), S. 3

[**2**] Bolus E. N.: Basic review of radiation biology and terminology. In: *J. Nucl. Technol.* 29 (2001), Nr. 2, S. 67- 73

[**3**] Rodrigues A. S., Oliveira N. G., Monteiro Gil O., Léonard A., Rueff J.: Use of cytogenetic indicators in radiobiology. In: *Radiat. Prot. Dosim.* 115 (2005), Nr. 1- 4, S. 455- 460

[**4**] Kiefer J.: Biologische Strahlenwirkung. 2. Aufl. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag, 1989

[**5**] Léonard A., Rueff J., Gerber G. B., Léonard E. D.: Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. In: *Radiat. Prot. Dosim.* 115 (2005), Nr. 1- 4, S. 448- 454

[**6**] Johnson D. G., Walker C. L.: Cyclins and cell cycle checkpoints. In: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 (1999), S. 295- 312

[**7**] Cafourková A., Lukášová E., Kozubek S., Kozubek M., Govorun R. D., Koutná I., Bártová E., Skalínová M., Jirsovná P., Paserková R., Krasavin E. A.: Exchange aberrations among 11 chromosomes of human lymphocytes induced by γ-rays. In: *Int. J. Radiat. Biol.* 77 (2001), Nr. 4, S. 419- 429

[**8**] Hlatky L., Sachs R. K., Vazquez M., Cornforth M. N.: Radiation-induced chromosome aberrations: insights gained from biophysical modelling. In: *BioEssay* 24 (2002), S. 714- 723

[**9**] Cremer C., Cremer T., Popp S., Durm M., Hausmann M.: Moderne Chromosomentests zur schnellen Detektion von Aberrationen in der biologischen Dosimetrie. In: *Deutsches Ärzteblatt* 92 (1995), Nr. 27, S. B-1408- B-1414

[**10**] Bauchinger M., Schmid E., Braselmann H.: Time-course of translocation and dicentric frequencies in a radiation accident case. In: *Int. J. Radiat. Biol.* 77 (2001), Nr. 5, S. 553- 557

[**11**] Lloyd D. C., Purrott R. J.: Chromosome aberration analysis in radiological protection dosimetry. In: *Radiat. Prot. Dosim.* 1 (1981), Nr. 1, S. 19- 28

[**12**] Lucas J. N., Awa A., Straume T., Poggensee M., Kodama Y., Nakano M., Ohtaki K., Weier H.-U., Pinkel D., Gray J., Littlefield G.: Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. In: *Int. J. Radiat. Biol.* 62 (1992), Nr. 1, S. 53- 63

[**13**] Montoro A., Rodríguez P., Almonacid M., Villaescusa J. I., Verdú G., Caballín M. R., Barrios L., Barquinero J. F.: Biological dosimetry in a group of radiologists by the analysis of dicentrics and translocations. In: *Radiat. Res.* 164 (2005), S. 612- 617

[**14**] Bender M., Gooch P. C.: Chromosome aberrations in irradiated humans. In: *Prog. Radiobiol.* 2 (1967), S. 1421- 1425

[**15**] Edwards A. A.: The use of chromosomal aberrations in human lymphocytes for biological dosimetry. In: *Radiat. Res.* 148 (1997), S. 39- 44

[**16**] Stronati L., Durante M., Gensabella G., Gialanella G., Grossi G. F., Pugliese M., Scampoli P., Sgura A., Testa A., Tanzarella C.: Calibration curves for biological dosimetry by fluorescence in situ hybridisation. In: *Radiat. Prot. Dosim.* 94 (2001), Nr. 4, S. 335- 345

[**17**] Lucas J. N., Hill F., Burk C., Fester T., Straume T.: Dose-response curve for chromosome translocations measured in human lymphocytes exposed to ^{60}Co gamma rays. In: *Health Phys. Soc.* 68 (1995), Nr. 6, S. 761- 765

[**18**] Wolff S.: Biological dosimetry with cytogenetic endpoints. In: *Prog. Clin. Biol. Res.* (1991), S. 351- 362

[**19**] Bauchinger M.: Retrospective dose reconstruction of human radiation exposure by FISH/ chromosome painting. In: *Mutat. Res.* 404 (1998), S. 89- 96

[**20**] Finnon P., Lloyd D. C., Edwards A. A.: Fluorescence in situ hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry. In: *Int. J. Radiat. Biol.* 68 (1995), Nr. 4, S. 429- 435

[**21**] Pala F. S., Moquet J. E., Edwards A. A., Lloyd D. C.: In vitro transmission of chromosomal aberrations through mitosis in human lymphocytes. In: *Mutat. Res.* 474 (2001), S. 139- 146

[**22**] Voth M., Klett R., Lengsfeld P., Stephan G., Schmid E.: Biological dosimetry after yttrium-90 citrate colloid radiosynoviorthesis. In: *Nuklearmedizin* 45 (2006), S. 223- 228

[**23**] Pressl S., Wenzel S., Reisige M., Westphal D., Stephan G.: Mittels FISH analysierte Chromosomenaberrationen an einer Kontrollgruppe. In: *BfS Jahresbericht, Fachbereich Strahlenhygiene, Wissenschaftliche Kurzberichte* (1997), S. 11

[**24**] Tucker J. D., Moore D. H.: The importance of age and smoking in evaluating adverse cytogenetic effects of exposure to environmental agents. In: *Environ. Health Perspect.* 104 (1996), Nr. 3, S. 489- 492

[**25**] Lindholm C., Luomahaara S., Koivistoinen A., Ilus T., Edwards A. A., Salomaa S.: Comparison of dose-response curves for chromosomal aberrations established by chromosome painting and conventional analysis. In: *Int. J. Radiat. Biol.* 74 (1998), Nr. 1, S. 27- 34

[**26**] Pressl S., Reisige M., Wenzel S., Westphal D., Stephan G.: Chromosomenaberrationen in gesunden Kontrollpersonen. In: *BfS Jahresbericht, Fachbereich für Strahlenhygiene, Wissenschaftliche Kurzberichte* (1998), S. 11

[**27**] Lucas J. N., Tenjin T., Straume T., Pinkel D., Moore D., Litt M., Gray J. W.: Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence in situ hybridization. In: *Int. J. Radiat. Biol.* 56 (1989), Nr. 1, S. 35- 44

[**28**] Bianchi M., Bianchi N. O., Brewen J. G., Buckton K. E., Fabry L., Fischer P., Gooch P. C., Kucerova M., Léonard A., Mukherjee R. N., Mukherjee U., Nakai S., Natarajan A. T., Obe G., Palitti F., Pohl-Rüling J., Schwarzacher H. G., Scott D., Sharma T., Takahashi E., Tanzarella C., van Buul P. P. W.: Evaluation of radiation-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes in vitro: result of an IAEA-coordinated programme. In: *Muatat. Res.* 96 (1982), Nr. 2- 3, S. 233- 242

[**29**] Gooch P. C., Bender M. A., Randolph M. L.: Chromosome aberrations induced in human somatic cells by neutrons. In: *Biological effects of neutron and proton irradiation* 1 (1964), S. 325- 342

[**30**] Menz R., Andres R., Larsson B., Ozsahin M., Trott K., Crompton N. E. A.: Biological dosimetry: the potential use of radiation-induced apoptosis in human T-lymphocytes. In: *Radiat. Environ. Biophys.* 36 (1997), S. 175- 181

[**31**] Han T., Dadey B.: T-lymphocyte dependency of B-lymphozyte blastogenic response to phytomitogens. In: *Immunology* 34 (1978), S. 625- 629

[**32**] Gall J. G., Pardue M. L.: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63 (1969), S. 378- 383

[**33**] Pardue M. L., Gall J. G.: Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64 (1969), S. 600- 604

[**34**] Leitch A. R., Schwarzacher T., Jackson D., Leitch I. J., Leitch A. R. (Hrsg.), Bettenhausen B. (Hrsg.): In situ-Hybridisierung. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1994

[**35**] Langer P. R., Waldrop A. A., Ward D. C.: Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), Nr. 11, S. 6633- 6637

[**36**] Pinkel D., Straume T., Gray J. W.: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986), S. 2934- 2938

[**37**] Tucker J. D., Morgan W. F., Awa A. A., Bauchinger M., Blakey D., Cornforth M. N., Littlefield L. G., Natarajan A. T., Shasserre C.: A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. In: *Cytogenet. Cell Genet.* 68 (1995), S. 211- 221

[**38**] Fellinger K., Schmid J.: Die lokale Behandlung rheumatischer Erkrankungen. In: *Wiener Zeitschrift für innere Medizin und ihre Grenzgebiete: Organ der Wiener Gesellschaft für innere Medizin* 33 (1952), 9, S. 351- 63

[**39**] Lueders C., Kopeć M., Morstin K., Schmitz T., Feinendegen L. E.: Die Radiosynoviorthese: Anwendung und Durchführung unter besonderer Berücksichtigung dosimetrischer Aspekte. In: *Akt. Rheumatol.* 17 (1992), S. 74- 81

[**40**] Mödder G.: Die Radiosynoviorthese: Nuklearmedizinische Gelenktherapie in Rheumatologie und Orthopädie. Meckenheim: Warlich Druck und Verlagsges. mbH, 1995

[**41**] Schneider P., Farahati J, Reiners C.: Radiosynovectomy in rheumatology, orthopedics and hemophilia. In: *J. Nucl. Med.* 46 (2005), Nr. 1, S. 48- 54

[**42**] Bundesgesundheitsamt: Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln: Aufbereitungsmonographien für den humanmedizinischen Bereich: Yttrium 90. In: *Bundesanzeiger* (1990), Nr. 149, S. 4069

[**43**] Heuft-Dorenbosch L. L. J., de Vet H. C. W., van der Linden S.: Yttrium radiosynoviorthesis in the treatment of knee arthritis in rheumatoid arthritis: a systematic review. In: *Ann. Rheum. Dis.* 59 (2000), S. 583- 586

[**44**] Kampen W. U., Matis E., Czech N., Soti Z., Gratz S., Henze E.: Serious complications after radiosynoviorthesis: survey on frequency and treatment modalities. In: *Nuklearmedizin* 45 (2006), S. 262- 268

[**45**] De La Chapelle A., Oka M., Rekonen A., Ruotsi A.: Chromosome damage after intra-articular injections of radioactive yttrium: effekt of immobilization on the biological dose. In: *Ann. Rheum. Dis.* 31 (1972), S. 508- 512

[**46**] Cannas M., Beltrami V., Lamberti L., Bigatti P.: Cytogenetic study on the circulating lymphoctes of rheumatoid arthritis patients treated with yttrium-90. In: *Med. Sci. Res.* 22 (1994), S. 133- 135

[**47**] Daker M.: Prospective Studie über Chromosomenanalysen bei 30 Patienten mit Yttrium-90-Synovectomie. In: *Therapiewoche* 29 (1979), Nr. 4, S. 492- 496

[**48**] Doyle D. V., Glass J. S., Gow P. J., Daker M., Grahame R.: A clinical and prospective chromosomal study of yttrium-90 synovectomy. In: *Rheumatol. Rehabilit.* 16 (1977), Nr. 4, S. 217- 222

[**49**] Gumpel J. M., Stevenson A. C.: Chromosomal damage after intra-articular injection of different colloids of yttrium-90. In: *Rheumatol. Rehabilit.* 14 (1975), Nr. 1, S. 7- 12

[**50**] Prosser J. S., Izard B. E., Brown J. K., Hetherington E. L. R., Lambrecht R. M., Cato L., Wallace M., Whitwell J., Wiseman J., Hoschl R., George S., Laurent R., Butler P., Smart R., Edmonds J., Lovegrove F., Warwick A.: Induction of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of patients treated for rheumatoid or osteo-arthritis of the knee with dysprosium-165 hydroxide macroaggregates or yttrium-90 silicate. In: *Cytobios* 73 (1993), S. 7- 15

[**51**] Stevenson A. C., Bedford J., Dolphin G. W., Purrott R. J., Lloyd D. C., Hill A. G. S., Hill H. F. H., Gumpel J. M., Williams D., Scott J. T., Ramsey N. W., Bruckner F. E., Fearn C. B. D. A.: Cytogenetic and scanning study of patients receiving intra-articular injections of gold-198 and yttrium-90. In: *Ann. Rheum. Dis.* 32 (1973), S. 112- 123

[**52**] Klett R., Puille M, Steiner D., Bauer R.: Radiation synovectomy of the knee joint: evaluation of bremsstrahlung-detection by using a corpse phantom. In: *Nuklearmedizin* 45 (2006), S. 57- 61

[**53**] Morton N. E.: Parameters of human genome. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), S. 7474- 7476

[**54**] Bickmore W. A., Teague P.: Influences of chromosome size, gene density and nuklear position on the frequency of constitutional translocations in the human population. In: *Chromosome Res.* 10 (2002), S. 707- 715

[**55**] Cigarrán S., Barrios L., Barquinero J. F., Caballín M. R., Ribas M., Egozcue J.: Relationship between the DNA content of human chromosomes and their involvement in radiation-induced structural aberrations, analysed by painting. In: *Int. J. Radiat. Biol.* 74 (1998), Nr. 4, S. 449- 455

[**56**] Böcker W., Müller W.-U., Streffer C., Hering K. G. (Hrsg.), Reiners C. (Hrsg.), Messerschmidt O. (Hrsg.): Aktuelle Fragen zu Strahlenschutzregelungen und individueller Strahlenempfindlichkeit. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. In: *Strahlenschutz in Forschung und Praxis* 40 (1998), S. 181

[**57**] Becker W.: Therapie der Schilddrüsenautonomie. In: *Klinische Wochenschrift* 68 (1990), S. 640- 646

[**58**] Lloyd D. C., Edwards A. A., Leonard A., Deknudt G. L., Verschaeve L., Natarajan A. T., Darroudi F., Obe G., Palitti F., Tanzarella C., Twan E. J.: Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced in vitro by very low doses of X-rays. In: *Int. J. Radiat. Biol.* 61 (1992), Nr. 3, S. 335- 343

[**59**] Barquinero J. F., Cigarrán S., Caballín M. R., Braselmann H., Ribas M., Egozcue J., Barrios L.: Comparison of X-ray dose-response curves obtained by chromosome painting using conventional and PAINT nomenclatures. In: *Int. J. Radiat. Biol.* 75 (1999), Nr. 12, S. 1557- 1566

[**60**] Surrallés J., Sebastian S., Natarajan A. T.: Chromosomes with high gene density are preferentially repaired in human cells. In: *Mutagenesis* 12 (1997), Nr. 6, S. 437- 442

[**61**] Chen J., Nekolla E., Kellerer A. M.: A comparative study of microdosimetric properties of x-rays, γ-rays and β-rays. In: *Radiat. Environ. Biophys.* 35 (1996), S. 263- 266

[**62**] Schmid E., Selbach H.-J., Voth M., Pinkert J., Gildehaus F. J., Klett R., Haney M.: The effect of the β-emitting yttrium-90 citrate on the dose-response of dicentric chromosomes in human lymphocytes: a basis for biological dosimetry after radiosynoviorthesis. In: *Radiat. Environ. Biophys.* 45 (2006), S. 93- 98

[**63**] Prosser J. S., Lloyd D. C., Edwards A. A., Stather J. W.: The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by exposure to tritiated water in vitro. In: *Radiat. Prot. Dosim.* 4 (1983), Nr. 1, S. 21- 26

[**64**] Edmonds J., Smart R., Laurent R., Butler P., Brooks P., Hoschl R., Wiseman J., George S., Lovegrove F., Warwick A., Owen E., Webb J., Booth R., Clemens L., McLaren A., Druce M., Hetherington E., Prosser S., Whitwell J., Lambrecht R.: A comparative study of the safety and efficacy of dysprosium-165 hydroxide macro-aggregate and yttrium-90 silicate colloid in radiation synovectomy: a multicentre double blind clinical trial. In: *Br. J. Rheumatol.* 33 (1994), Nr. 10, S. 947- 953

[**65**] Klett R., Puille M., Matter H. P., Steiner D., Stürz H., Bauer R.: Aktivitätsabtransport und Strahlenexposition durch die Radiosynoviorthese des Kniegelenkes: Einfluss unterschiedlicher Therapiemodalitäten. In: *Z. Rheumatol.* 58 (1999), Nr. 4, S. 207- 212

[**66**] Lucas J. N., Hill F. S., Burk C. E., Lewis A. D., Lucas A. K., Chen A. M., Sailes F. C., Straume T.: Dose-response curve for chromosome translocations induced by low dose rate ^{137}Cs gamma rays. In: *Radiat. Prot. Dosim.* 71 (1997), Nr. 4, S. 279- 282

[**67**] Dolphin G. W.: Biological hazards of radiation. In: *Ann. Rheum. Dis.* 32 (1973), S. 23- 28

[**68**] Hoffmann W., Heimers A., Brede H. J., Giesen U., Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (Hrsg.): Beeinflussung der Ergebnisse der biologischen Dosimetrie durch Zellzyklusverzögerungen bei höheren Dosen. In: *Schriftenreihe Reaktorsicherheit und Strahlenschutz* (2005), S. 1- 23

[**69**] Lloyd D. C., Dolphin G. W., Purrott R. J., Tipper P. A.: The effect of x-ray induced mitotic delay and chromosome aberration yields in human lymphocytes. In: *Mutat. Res.* 42 (1977), S. 401- 412

[**70**] Poncelet E., Léonard A., Léonard E. D., Dutrillaux B.: Biological dosimetry: radiation-induced mitotic delay can lead to an underestimate of the part of the body exposed after non-uniform irradiation. In: *Strahlentherapie und Onkologie* 164 (1988), Nr. 9, S. 542- 543

[**71**] Carloni M., Meschini R. Ovidi L., Palitti F.: PHA-induced cell proliferation rescues human peripheral blood lymphocytes from x-ray-induced apoptosis. In: *Mutagenesis* 16 (2001), Nr. 2, S. 115- 120

[**72**] Barquinero J. F., Barrios L., Caballín M. R., Miró R., Ribas M., Egozcue J.: Biological dosimetry in simulated in vitro partial irradiations. In: *Int. J. Radiat. Biol.* 71 (1997), Nr. 4, S. 435- 440

[**73**] Guerrero-Carbajal Y. C., Moquet J. E., Edwards A. A., Lloyd D. C.: The persistence of FISH translocations for retrospective biological dosimetry after simulated whole or partial body irradiation. In: *Radiat. Prot. Dosim.* 76 (1998), Nr. 3, S. 159- 168

[**74**] Lloyd D. C., Purrott R. J., Dolphin G. W.: Chromosome aberration dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation. In: *Phys. Med. Biol.* 18 (1973), Nr. 3, S. 421- 431

[**75**] Fabry L., Léonard A., Decat G., Deknudt G., Jacquet P., Léonard E. D. : Chromosome aberrations in mixed cultures of in vitro irradiated and unirradiated human lymphocytes. In: *Strahlentherapie und Onkologie* 164 (1988), Nr. 2, S. 108- 110

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

_____ _____

Ort, Datum Unterschrift

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Bauer, der mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation in seiner Abteilung zu erstellen, sowie dem Team der nuklearmedizinischen Abteilung der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Insbesondere meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Dipl. Phys. Klett gilt ein ausgesprochen großer Dank für die Vergabe des Themas, für seine Tatkraft bei der Durchführung der nuklearmedizinischen Verfahren, für die freundliche und konstruktive Hilfestellung bei der schriftlichen Niederlegung, sowie für seine Geduld bei der Beantwortung jeglicher Fragen und für seine aufmunternden und erfrischenden Worte, die mir stets Mut machten.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Kiefer und den Mitarbeitern des Strahlenzentrums für die Überlassung der Räumlichkeiten und die Hilfestellung im Labor.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich hier an Frau Dr. Schmitz richten, die mir mit sehr viel Engagement bei der praktischen Umsetzung zur Seite stand und mir mit fachkundigen und freundschaftlichen Rat während der gesamten Dissertationszeit eine vertraute Ansprechpartnerin war.

Nicht versäumen möchte ich, mich bei den Patienten für ihre Zustimmung und Teilnahme an dieser Arbeit zu bedanken.

Ein persönliches Dankeschön geht an meinem lieben Ehemann Steffen für die unermüdliche Literaturbeschaffung, für die technische Hilfestellung am PC, für sein Verständnis und seine Geduld sowie für die nötige „Work-Life-Balance“.

Die Widmung gebührt in Verbundenheit meinem Vorbild Dr. Siecke.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder für ihre uneingeschränkte Unterstützung auf meinem privaten und beruflichen Lebensweg. Mit wertvollen Ratschlägen, Tat, Humor und Herzenswärme haben sie mich durch die Tiefen, nicht nur dieser Dissertation, getragen, und daher widme ich auch ihnen diese Arbeit.

Ebenso sei all denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.