

**Zeit- und Dosisabhängigkeit von DNA-Schäden induziert
durch interne Bestrahlung mit unterschiedlichen
Radionukliden**

**Time and dose dependence of DNA damage induced by
internal irradiation with various radionuclides**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

vorgelegt von

Sarah Schumann

aus

Reutlingen

Würzburg, 2020

Eingereicht am: 30. September 2020

Mitglieder des Promotionskomitees:

- Vorsitzender: Prof. Dr. Peter Jakob
1. Betreuer: Prof. Dr. Michael Laßmann
2. Betreuerin: Prof. Dr. Tcholpon Djuzenova
3. Betreuer: Prof. Dr. Andreas Buck
4. Betreuerin: Dr. Uta Eberlein

Tag des Promotionskolloquiums: 14. Januar 2021

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische und methodische Grundlagen	5
2.1	Überblick	5
2.2	Radioaktiver Zerfall und verwendete Radionuklide	5
2.2.1	Radioaktivität	5
2.2.2	α -Zerfall	6
2.2.3	β -Zerfall	7
2.2.4	γ -Zerfall	8
2.2.5	Verwendete Radionuklide	9
2.3	Aktivitätsbestimmung	11
2.3.1	Überblick	11
2.3.2	Bestimmung der Aktivität im Blut	12
2.3.3	Bestimmung der Aktivität im Ganzkörper	14
2.4	Berechnung der Energiedosis im Blut	14
2.4.1	Allgemeine Berechnung der Energiedosis	14
2.4.2	Blutbasierte Dosimetrie	15
2.5	Biologische Dosimetrie	16
2.5.1	Biomarker zum Nachweis von ionisierender Strahlung	16
2.5.2	γ -H2AX und 53BP1 als Biomarker für DNA-Schäden	17
2.5.3	Probenaufbereitung für den γ -H2AX+53BP1-Assay	18
2.6	Auswertung der Daten und statistische Analyse	20
3	Dosisabhängige Induktion von DNA-Schäden nach interner <i>Ex-vivo</i>-Bestrahlung	21
3.1	Einleitung	21
3.2	Methoden	21
3.2.1	Versuchspersonen und Versuchsreihen	21
3.2.2	<i>Ex-vivo</i> -Bestrahlung der Blutproben	22
3.2.3	Berechnung der Energiedosis im Blut	22
3.2.4	γ -H2AX+53BP1-Assay	23
3.3	Ergebnisse	23
3.3.1	γ -H2AX+53BP1 Foci und Spuren	23
3.3.2	<i>Ex-vivo</i> -Kalibrierkurve für β - und γ -Emitter	25
3.3.3	<i>Ex-vivo</i> -Kalibrierkurve für α -Emitter	27
3.4	Zusammenfassung und Diskussion	30

4	Zeit- und Dosisabhängigkeit von DNA-Schäden während Therapie mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA	35
4.1	Einleitung	35
4.2	Methoden	35
4.2.1	Patienten	35
4.2.2	Blutentnahmen und Dosisleistungsmessungen	36
4.2.3	Berechnung der Energiedosis im Blut	36
4.2.4	γ -H2AX+53BP1-Assay	37
4.3	Ergebnisse	37
4.3.1	Patienten	37
4.3.2	Dosimetrie	38
4.3.3	γ -H2AX+53BP1 Foci	39
4.3.4	Korrelationen mit klinischen Parametern	41
4.4	Zusammenfassung und Diskussion	42
5	Zeit- und Dosisabhängigkeit von DNA-Schäden während PET/CT-Diagnostik mit [⁶⁸Ga]Ga-PSMA	45
5.1	Einleitung	45
5.2	Methoden	45
5.2.1	Patienten	45
5.2.2	Blutentnahmen und Dosisleistungsmessungen	46
5.2.3	Berechnung der Energiedosis im Blut	46
5.2.4	<i>Ex-vivo</i> -Kalibrierung zur Abschätzung der CT-Dosis	47
5.2.5	γ -H2AX+53BP1-Assay	48
5.3	Ergebnisse	48
5.3.1	Patienten	48
5.3.2	Dosimetrie	49
5.3.3	γ -H2AX+53BP1 Foci	50
5.3.4	<i>Ex-vivo</i> -Kalibrierung zur Abschätzung der CT-Dosis	52
5.4	Zusammenfassung und Diskussion	53
6	Zeit- und Dosisabhängigkeit von DNA-Schäden während Therapie mit [²²³Ra]RaCl₂	57
6.1	Einleitung	57
6.2	Methoden	57
6.2.1	Patienten	57
6.2.2	Blutentnahmen	57
6.2.3	Berechnung der Energiedosis im Blut	58
6.2.4	γ -H2AX+53BP1-Assay	58
6.3	Ergebnisse	58
6.3.1	Patienten	58
6.3.2	Dosimetrie	59
6.3.3	γ -H2AX+53BP1 Foci	60
6.4	Zusammenfassung und Diskussion	62

7	Zusammenfassung	65
8	Summary	69
9	Literaturverzeichnis	73
A	Angaben zur Finanzierung und zur Einhaltung ethischer Standards	81
B	Abkürzungen	83
C	Publikationsliste	85
D	Lebenslauf	89
E	Eidesstattliche Erklärung (Affidavit)	91
F	Danksagung	93

1 Einleitung

In der Nuklearmedizin werden Patienten radioaktive Substanzen, sogenannte Radiopharmaka, verabreicht, sodass eine interne Bestrahlung des Körpers stattfindet. Die ionisierende Strahlung wird genutzt, um in der nuklearmedizinischen Therapie gezielt bösartiges Gewebe zu zerstören beziehungsweise um in der nuklearmedizinischen Diagnostik Stoffwechselforgänge bildlich darstellen zu können. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an neuen Radiopharmaka entwickelt. Sehr erfolgreiche Entwicklungen gab es insbesondere auf dem Gebiet der Therapie und Diagnostik des Prostatakarzinoms. 2013 wurde $^{223}\text{Ra}[\text{RaCl}_2]$ als erstes α -emittierendes Radiopharmakon zur Behandlung von Knochenmetastasen bei fortgeschrittenem Prostatakarzinom zugelassen. Aufgrund ihrer kurzen Reichweite eignen sich α -Teilchen sehr gut für therapeutische Anwendungen in der Nuklearmedizin und als Calciumanalogon wird $^{223}\text{Ra}[\text{RaCl}_2]$ hauptsächlich in den Knochen eingebaut [1]. Eine weitere sehr vielversprechende Option für die Therapie, aber auch für die Diagnostik, bieten mit Radionukliden markierte PSMA-bindende Liganden. Das prostataspezifische Membranantigen (PSMA) ist in Prostatakarzinomzellen stark überexprimiert und damit ein sehr geeignetes Zielantigen für therapeutische Wirkstoffe sowie die diagnostische Bildgebung [2, 3]. Zur Therapie können PSMA-Liganden mit α - oder β^- -Emittlern, wie beispielsweise ^{225}Ac oder ^{177}Lu markiert werden. In Verbindung mit β^+ -emittierenden Radionukliden, wie beispielsweise ^{68}Ga , können einige PSMA-Liganden auch für die Diagnostik mittels Positronenemissionstomographie (PET) eingesetzt werden.

Die ionisierende Strahlung der Radionuklide zerstört jedoch nicht nur bösartiges Gewebe, sondern kann auch DNA-Schäden in gesunden Zellen verursachen. Daher ist darauf zu achten, dass die deponierte Energie pro Masse, die Energiedosis, in bestimmten Risikoorganen nicht zu hoch ist. Eines der Risikoorgane für gezielte Radionuklidtherapien ist das blutbildende System. Da zur Abschätzung der Energiedosis im Knochenmark häufig die Energiedosis im Blut als Surrogat verwendet wird, ist die Kenntnis dieser und insbesondere ihrer Korrelation mit strahlungsinduzierten DNA-Schäden in Blutzellen von großem Interesse [4, 5].

Unter den verschiedenen Arten von DNA-Schäden sind DNA-Doppelstrangbrüche die kritischsten Läsionen, da sie schwer zu reparieren sind und fehlerhafte Reparatur zu Mutationen oder zum Zelltod führen kann. Strahlungsinduzierte DNA-Doppelstrangbrüche verursachen im umgebenden Chromatin die Phosphorylierung des Histons H2AX (dann γ -H2AX genannt) sowie die Akkumulation des Proteins 53BP1, das an der Stelle um den Doppelstrangbruch an das geschädigte Chromatin bindet und die Signalwege der DNA-Reparatur beeinflusst [6, 7]. Durch Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern für γ -H2AX und 53BP1 lassen sich in den Zellkernen kleine Foci, welche die Marker enthalten, unter dem Mikroskop sichtbar machen. Durch das Zählen dieser Foci ist somit ein quantitativer Nachweis strahlungsinduzierter Doppelstrangbrüche, insbesondere auch im Bereich niedriger Energiedosen, möglich [5, 8].

Während in den letzten Jahren zahlreiche Studien zum Nachweis von strahlungsinduzierten Doppelstrangbrüchen mittels des γ -H2AX-Assays nach externer Bestrahlung publiziert wurden, ist die Anzahl entsprechender Publikationen mit dem Schwerpunkt auf interner Bestrahlung sehr viel geringer. Insbesondere gab es vor dieser Arbeit nur wenige Studien, in denen eine Korrelation zwischen der Energiedosis und den quantifizierten DNA-Doppelstrangbrüchen hergestellt werden konnte [9–11]. Mit diesen Studien von Eberlein *et al.* wurde der Assay *ex vivo* und *in vivo* für die β^- -emittierenden Radionuklide ^{131}I und ^{177}Lu etabliert.

Indem Eberlein *et al.* Blutproben von Versuchspersonen durch die Zugabe von ^{131}I und ^{177}Lu in unterschiedlichen Aktivitätskonzentrationen intern *ex vivo* bestrahlten, konnte gezeigt werden, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der strahlungsinduzierten γ -H2AX+53BP1-Foci in den mononuklearen Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) und der Energiedosis im Blut besteht [9]. Darüber hinaus konnten Eberlein *et al.* auch *in vivo* die Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in den PBMCs von Patienten während Radioiodtherapie und während Therapie mit [^{177}Lu]Lu-DOTA-D-Phe-Tyr3-octreotate beziehungsweise [^{177}Lu]Lu-DOTA-D-Phe-Tyr3-octreotide beschreiben [10, 11]. Während sich in den ersten Stunden nach Therapiebeginn ein Anstieg der strahlungsinduzierten γ -H2AX+53BP1-Foci zeigte, folgte zu späteren Zeitpunkten ein Rückgang der Foci aufgrund der fortschreitenden DNA-Reparatur. Da die interne Bestrahlung kontinuierlich, jedoch mit abnehmender Dosisleistung erfolgt, unterscheidet sich das zeit- und dosisabhängige Verhalten der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche während nuklearmedizinischer Therapien von den Beobachtungen nach externer Bestrahlung [10, 11].

Da sich die bisherigen Untersuchungen auf die Nuklide ^{131}I und ^{177}Lu beschränkten, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Dosisabhängigkeit des Assays *ex vivo* für weitere in der Nuklearmedizin verwendete Radionuklide, auch für α -Emitter, zu untersuchen und die Patientenuntersuchungen auf weitere Radionuklide und Liganden zu erweitern.

Ein erstes Ziel war es, zu untersuchen, ob unterschiedliche Emissionseigenschaften von Radionukliden die etablierte *Ex-vivo*-Kalibrierkurve beeinflussen. Dafür sollten Blutproben von Versuchspersonen erneut mit dem β^- -Emitter ^{177}Lu , aber auch zusätzlich mit dem höher energetischen β^- -Emitter ^{90}Y , dem in der PET eingesetzten β^+ -Emitter ^{68}Ga und dem in der konventionellen Diagnostik verwendeten γ -Emitter ^{99m}Tc versetzt werden. Dabei sollte überprüft werden, ob es Unterschiede in der dosisabhängigen Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen gibt, die nuklidspezifisch oder abhängig von der Versuchsperson sind. Da zunehmendes Interesse am Einsatz von α -emittierenden Radionukliden für die nuklearmedizinische Therapie besteht, sollte im Rahmen dieser Arbeit des Weiteren erstmals eine entsprechende *Ex-vivo*-Kalibrierkurve für α -Emitter, unter Verwendung der Radiumisotope ^{223}Ra und ^{224}Ra , erstellt und Unterschiede in der Schadensinduktion im Vergleich zu β^- und γ -Emittern analysiert werden.

Zu den neuen Entwicklungen im Bereich der Therapie und Diagnostik des Prostatakarzinoms wurden bislang keine Studien durchgeführt, welche die zeit- und dosisabhängige Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Blutzellen *in vivo* nach Verabreichung der Radiopharmaka beschreiben. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher zunächst erstmalig die Zeit- und Dosisabhängigkeit von DNA-Doppelstrangbrüchen während Therapie mit [^{177}Lu]Lu-PSMA untersucht werden. Des Weiteren sollte eine entsprechende *In-vivo*-Studie während diagnostischer PET/CT-Untersuchungen mit [^{68}Ga]Ga-PSMA durchgeführt werden. In einer dritten *In-vivo*-Studie sollte zudem erstmalig der Verlauf von DNA-Schäden während Therapie mit dem α -Emitter

$[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ charakterisiert werden. Insgesamt sollten die Ergebnisse der *In-vivo*-Studien mit den Resultaten der entsprechenden *Ex-vivo*-Bestrahlungen verglichen werden. Ein weiteres Ziel war es, soweit möglich, interindividuelle Unterschiede im Verlauf der Energiedosis im Blut sowie der Schadensinduktion und -reparatur zwischen den Patienten zu analysieren, da ein besseres Verständnis dieser langfristig zur Optimierung der Therapien und diagnostischen Untersuchungen beitragen könnte.

Im folgenden Kapitel 2 wird zunächst auf die wichtigsten theoretischen Grundlagen sowie die grundlegenden Methoden dieser Arbeit eingegangen. In Kapitel 3 werden die Ergebnisse der *Ex-vivo*-Experimente mit unterschiedlichen α -, β - und γ -emittierenden Radionukliden vorgestellt, während die folgenden Kapitel die Ergebnisse zur Zeit- und Dosisabhängigkeit der DNA-Schäden während Therapie mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA}$ (Kapitel 4), während Diagnostik mit $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA}$ (Kapitel 5) und während Therapie mit $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ (Kapitel 6) beinhalten. Abschließend folgt in Kapitel 7 eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit mit einem Ausblick auf mögliche weiterführende Forschungsthemen.

2 Theoretische und methodische Grundlagen

2.1 Überblick

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der dosisabhängigen Induktion und Reparatur von DNA-Schäden in Blutzellen nach interner Bestrahlung mit unterschiedlichen Radionukliden. Die interne Bestrahlung erfolgt sowohl *in vivo*, das heißt in Patienten während Radionuklidtherapie oder nuklearmedizinischer Diagnostik, als auch *ex vivo*, das heißt durch die Abnahme von Blutproben von gesunden Versuchspersonen und der anschließenden Zugabe von Radionukliden.

In diesem Kapitel sollen die wichtigsten theoretischen Grundlagen sowie die allen Versuchsteilen zugrundeliegende Methodik erklärt werden. Beginnend mit einigen Grundlagen zum radioaktiven Zerfall, soll im ersten Abschnitt 2.2 insbesondere auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Radionuklide und deren unterschiedlichen Strahlenqualitäten eingegangen werden. Im nächsten Abschnitt 2.3 folgt dann eine Beschreibung der Methoden zur Aktivitätsbestimmung. Die Kenntnis der Aktivität beziehungsweise des zeitlichen Verlaufs der Aktivität *in vivo* ist entscheidend für die Bestimmung der absorbierten Strahlungsenergie im Körper, für die Dosimetrie. Abschnitt 2.4 befasst sich mit den Grundlagen zur Berechnung der Energiedosis im Allgemeinen und insbesondere mit der Berechnung der Energiedosis im Blut, die im Vordergrund dieser Arbeit steht. Ergänzend zur hier beschriebenen „physikalischen Dosimetrie“ spielen biologische Dosimetrieverfahren eine immer bedeutendere Rolle. Ein Überblick über Biomarker, die zur Quantifizierung von Strahlenschäden eingesetzt werden, ist in Abschnitt 2.5 gegeben. Dazu gehören auch die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Biomarker für DNA-Doppelstrangbrüche, γ -H2AX und 53BP1. In Abschnitt 2.5 wird daher auch speziell auf diese Biomarker eingegangen sowie die verwendete Methodik zur Aufbereitung der Blutproben für die Auswertung mittels des γ -H2AX+53BP1-Assays erläutert. Abschließend sollen in Kapitel 2.6 die generell verwendeten Methoden zur Datenauswertung und zur statistischen Analyse beschrieben werden.

2.2 Radioaktiver Zerfall und verwendete Radionuklide

2.2.1 Radioaktivität

Als Radioaktivität wird die spontane Umwandlung des Atomkerns eines Mutternuklids (X) in den Kern eines Tochternuklids (Y) bezeichnet. Radioaktive Atomkerne gehen dabei unter Aussendung von Strahlung und Energieabgabe von einem instabilen in einen stabileren Zustand über. Sind die Tochterkerne ebenfalls radioaktiv, folgen weitere Umwandlungen bis zum Zustand minimaler Energie und man spricht von Zerfallsketten [12].

Da radioaktive Umwandlungen statistischen Gesetzen unterliegen, kann lediglich die Wahrscheinlichkeit, die sogenannte Zerfallskonstante λ , für eine Änderung des Kernzustands in einem Zeitintervall

dt angegeben werden. Für N instabile Kerne ist die Abnahme dN im Zeitintervall dt proportional zur noch vorhandenen Anzahl instabiler Kerne und zur Zerfallskonstanten λ , woraus sich das Zerfallsgesetz ergibt, über das die Aktivität A definiert ist:

$$A = -\frac{dN}{dt} = \lambda N \quad (2.1)$$

Durch Integration erhält man:

$$A(t) = A_0 \exp(-\lambda t) \quad (2.2)$$

Dabei wird von N_0 aktiven Kernen zum Zeitpunkt $t = 0$ ausgegangen und $A_0 = N_0 \cdot \lambda$ bezeichnet die Anfangsaktivität. Die Aktivität wird in der Einheit Becquerel ($1 \text{ Bq} = 1 \text{ s}^{-1}$) angegeben. Die Halbwertszeit T ist definiert als die Zeit, nach der die Aktivität auf die Hälfte der Anfangsaktivität abgenommen hat:

$$T = \frac{\ln 2}{\lambda} \quad (2.3)$$

Die Zerfallskonstante λ und damit auch die Halbwertszeit T sind spezifisch für jedes Nuklid. Wird nicht allein der hier beschriebene physikalische Zerfall betrachtet, sondern beispielsweise die Abnahme der Aktivität im Körper, zu der auch biologische Ausscheidungsvorgänge beitragen, müssen zusätzlich zu $\lambda = \lambda_{\text{phys}}$ individuelle biologische Zerfallskonstanten λ_{biol} berücksichtigt werden, sodass sich effektiv $\lambda_{\text{eff}} = \lambda_{\text{phys}} + \lambda_{\text{biol}}$ ergibt. Die Halbwertszeit verkürzt sich dann entsprechend auf T_{eff} [12].

2.2.2 α -Zerfall

Durch die starke Wechselwirkung zerfällt beim α -Zerfall der Mutterkern unter Emission eines Helium-Kerns (${}^4_2\text{He}$), dem α -Teilchen, in den Tochterkern. Dabei verringert sich die Massenzahl A um 4 und die Ordnungszahl Z um 2:



ΔE bezeichnet die durch den Zerfall freiwerdende Energie. Diese verteilt sich nach den Gesetzen der Energie- und Impulserhaltung auf das α -Teilchen und den Tochterkern. Die von einem bestimmten Nuklid emittierten α -Teilchen haben damit eine ganz bestimmte kinetische Energie, sodass sich ein für jedes Nuklid charakteristisches, diskretes Energiespektrum beobachten lässt [12]. Die kinetische Energie der α -Teilchen, die von in der Nuklearmedizin eingesetzten Radionukliden emittiert werden, liegt typischerweise zwischen 4 MeV und 9 MeV [13].

Beim Auftreffen auf Materie können α -Teilchen diese direkt ionisieren. Bis zu ihrer vollständigen Abbremsung übertragen die α -Teilchen ihre Energie durch viele Wechselwirkungsprozesse auf die umgebende Materie. Die Kurve, die den Energieverlust pro Weegeinheit beschreibt, wird Bragg-Kurve genannt. Am Ende der Teilchenbahn nehmen die Ionisationen zu, sodass kurz vor der vollständigen Abbremsung der Teilchen der sogenannte Bragg-Peak, das Maximum der Bragg-Kurve, erreicht wird [12, 14]. Die Reichweite von α -Teilchen in Wasser oder Gewebe beträgt weniger als 100 μm , abhängig von der Energie der Teilchen [12, 13]. Da Ionisationsereignisse in einem kleinen Volumen um die Bahnspur herum erfolgen, gehören α -Teilchen zu den dicht

ionisierenden Strahlungsarten. Als Maß dafür dient der lineare Energietransfer (LET). Dieser beschreibt den mittleren Energieübertrag auf das absorbierende Material pro zurückgelegter Wegstrecke des Teilchens und wird üblicherweise in der Einheit $\text{keV } \mu\text{m}^{-1}$ angegeben [12, 15]. In Wasser oder Gewebe haben α -Teilchen mit Energien zwischen 4 MeV und 9 MeV einen LET von etwa $100 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$ bis $50 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$ [12].

Beispiele für α -Emitter sind die Nuklide ^{223}Ra und ^{224}Ra , die im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden.

2.2.3 β -Zerfall

Durch die schwache Wechselwirkung wandelt sich beim β -Zerfall der Mutterkern unter Emission eines Elektrons (β^-) oder eines Positrons (β^+) in den Tochterkern um. Die Massenzahl A bleibt erhalten, während sich die Ordnungszahl Z um 1 ändert.

Der β^- -Zerfall tritt bei Nukliden auf, die einen Neutronenüberschuss gegenüber stabileren Kernen aufweisen. Unter Emission eines Elektrons (e^-) und eines Antineutrinos ($\bar{\nu}$) wird beim β^- -Zerfall ein Neutron (n) in ein Proton (p) umgewandelt:



Die freiwerdende Energie ΔE verteilt sich in diesem Fall zufällig auf das Elektron und das Antineutrino. Dadurch kann das Elektron jede beliebige Bewegungsenergie zwischen Null und der maximalen freiwerdenden Energie annehmen, während die jeweilige Energiedifferenz auf das Antineutrino übertragen wird. Im Gegensatz zum α -Zerfall ist das Energiespektrum daher kontinuierlich [12].

Wie α -Teilchen gehören β -Teilchen aufgrund ihrer Ladung zur Kategorie der direkt ionisierenden Strahlung. β^- -Emitter wie beispielsweise ^{131}I , ^{177}Lu und ^{90}Y werden häufig in der nuklearmedizinischen Therapie eingesetzt. Die zurückgelegte Weglänge der β^- -Teilchen in Gewebe liegt zwischen 0,8 mm und 10 mm. Da die deponierte Energie pro zurückgelegter Strecke durchschnittlich etwa $0,2 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$ beträgt, spricht man von locker ionisierender (low LET) Strahlung [13]. Die Wechselwirkungsereignisse sind also eher gleichmäßig über das bestrahlte Volumen verteilt und dicht aufeinanderfolgende Ionisationen unwahrscheinlich [12]. Im Rahmen dieser Arbeit werden die β^- -Emitter ^{177}Lu und ^{90}Y verwendet.

Der β^+ -Zerfall tritt bei Nukliden mit Protonenüberschuss auf. Unter Emission eines Positrons (e^+) und eines Neutrinos (ν) wird beim β^+ -Zerfall ein Proton (p) in ein Neutron (n) umgewandelt:



In diesem Fall verteilt sich die freiwerdende Energie ΔE zufällig auf das Positron und das Neutrino. Wie oben für den β^- -Zerfall beschrieben ergibt sich ein kontinuierliches Energiespektrum [12].

Die Reichweite des emittierten Positrons im menschlichen Körper beträgt nur einige Millimeter, da bei der Wechselwirkung mit Materie eine Besonderheit auftritt: Trifft das Positron nach nahezu vollständigem Verlust seiner kinetischen Energie auf ein Elektron, kommt es zu einer Vernichtung des Teilchen-Antiteilchen-Paares (Annihilation) unter Aussendung zweier γ -Quanten. Aufgrund von Energie- und Impulserhaltung beträgt die Energie der γ -Quanten jeweils 511 keV (entsprechend der Ruheenergie von Elektron und Positron) und die beiden Vernichtungsquanten werden in entgegengesetzter Richtung, das heißt in einem 180° -Winkel, emittiert [12]. Diese Besonderheit wird für die PET genutzt. Durch ringförmig um den Patienten angeordnete Detektoren können zeitgleich in gegenüberliegenden Detektoren eintreffende Photonen (Koinzidenzen) nachgewiesen werden und daraus der Ort der Positronenemission berechnet werden. Somit kann die Verteilung des Radiopharmakons im Körper abgebildet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird der in der PET häufig eingesetzte β^+ -Emitter ^{68}Ga verwendet.

Neben dem β^+ -Zerfall tritt auch der Elektroneneinfang bei Atomkernen mit Protonenüberschuss auf. Ein Elektron einer inneren Schale der Elektronenhülle, meist der K-Schale, wird durch den Atomkern eingefangen und es bildet sich ein Neutron und ein Neutrino:



Das entstehende Elektronenloch in der inneren Schale wird durch ein Elektron einer äußeren Schale wieder gefüllt. Durch die dabei freiwerdende Energie kommt es zur Emission charakteristischer Röntgenstrahlung oder zum Auger-Effekt. Beim Auger-Effekt wird die freiwerdende Energie auf ein weiteres Elektron des Atoms übertragen, das die Elektronenhülle dann als sogenanntes Auger-Elektron verlässt [12].

2.2.4 γ -Zerfall

Durch die elektromagnetische Wechselwirkung kommt es bei Nukliden, die von einem angeregten Zustand (${}^A_Z\text{X}^*$) in den Grundzustand (${}^A_Z\text{X}$) übergehen, zur Emission von hochenergetischer Photonenstrahlung, zum γ -Zerfall.



Die Energie des emittierten γ -Quants entspricht der Energiedifferenz ΔE zwischen dem angeregten Zustand und dem Grundzustand. Das Spektrum ist daher diskret und charakteristisch für das Nuklid [12].

Häufig befindet sich das Tochternuklid nach einem α - oder β -Zerfall nicht im Grundzustand, sondern in einem angeregten Zustand, und es folgt ein γ -Zerfall in den Grundzustand. In vielen Fällen findet der Übergang in den Grundzustand unmittelbar (das heißt innerhalb von 10^{-12} s) statt und die entstehende γ -Strahlung wird dem Mutternuklid zugeordnet [14]. Die nuklidspezifischen Gammaspektren, die sich daraus ergeben, können beispielsweise zur Aktivitätsquantifizierung, zum Nachweis von Verunreinigungen oder zur Überprüfung des Gleichgewichtszustands bei Zerfallsketten genutzt werden. In einigen Fällen erfolgt der Übergang in den Grundzustand jedoch mit einer zeitlichen Verzögerung von einigen Minuten oder Stunden. In diesen Fällen spricht man von

metastabilen Kernzuständen und isomeren Übergängen [14]. Ein Beispiel hierfür ist das Nuklid ^{99m}Tc , das in der nuklearmedizinischen Diagnostik sehr häufig eingesetzt wird und auch in dieser Arbeit verwendet wird.

Generell werden γ -Emitter in der nuklearmedizinischen Diagnostik zur Bildgebung angewendet. Mit einer Gammakamera kann die Verteilung des γ -emittierenden Radionuklids im Körper des Patienten dargestellt werden. Während bei der planaren Szintigraphie die Verteilung der Aktivität in einer Ebene abgebildet wird, wird bei der Single Photon Emission Computed Tomographie (SPECT) ein dreidimensionales Bild der Aktivitätsverteilung erzeugt [15].

Im Gegensatz zu geladenen Teilchen wirken Photonen beim Auftreffen auf Materie nicht direkt ionisierend. Stattdessen kommt es bei der Wechselwirkung von Photonen mit Materie zur Erzeugung geladener Sekundärteilchen, welche dann ionisierend wirken. Als wichtigste Wechselwirkungsprozesse sind dabei der Photoeffekt, der Comptoneffekt und die Paarbildung zu nennen [12, 15]. Wie die β -Strahlung zählt auch die Sekundärelektronen produzierende γ -Strahlung aufgrund ihres geringen Ionisierungsvermögens zu den locker ionisierenden Strahlungsarten [12].

Der Übergang von einem angeregten Zustand in den Grundzustand kann auch ohne Emission von γ -Strahlung erfolgen, indem die Anregungsenergie auf ein Hüllenelektron übertragen wird. Nachdem das Elektron die Hülle verlässt, verbleibt bei der sogenannten Inneren Konversion das positiv geladene Atom zunächst als Ion ${}^A_Z\text{X}^+$:



Die Innere Konversion findet somit als Konkurrenzprozess zum γ -Zerfall statt. Auf das freiwerdende Elektron, das Konversionselektron, wird die Anregungsenergie abzüglich der Bindungsenergie übertragen. Wie beim Elektroneneinfang wird das entstehende Elektronenloch durch ein Elektron einer äußeren Schale wieder gefüllt und es kommt zur Emission charakteristischer Röntgenstrahlung oder zum Auger-Effekt [12].

2.2.5 Verwendete Radionuklide

Im Rahmen dieser Arbeit werden sechs Radionuklide mit unterschiedlichen Zerfallseigenschaften, das heißt unterschiedlicher Zerfallsart, Halbwertszeit und Übergangsenergie, verwendet. Eine Übersicht der verwendeten Radionuklide und ihren Zerfallseigenschaften ist in Tabelle 2.1 gegeben. Als Vertreter für β^- -emittierende Nuklide werden ^{177}Lu und ^{90}Y eingesetzt. ^{177}Lu zerfällt mit einer Halbwertszeit von 6,647 Tagen in das stabile ^{177}Hf . Mit einer Emissionswahrscheinlichkeit von 79,3% erfolgt der Übergang direkt in den Grundzustand mit der maximalen β -Energie von 498,3 keV [17]. Zum Einsatz in der Nuklearmedizin wird es beispielsweise mit den Peptiden DOTA-D-Phe-Tyr3-octreotate (DOTATATE) beziehungsweise DOTA-D-Phe-Tyr3-octreotide (DOTATOC) zur Therapie von neuroendokrinen Tumoren oder mit PSMA zur Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms markiert. Verglichen mit ^{177}Lu hat ^{90}Y eine 4,6-fach höhere maximale β -Energie von 2278,7 keV und eine kürzere Halbwertszeit von 2,6684 Tagen. ^{90}Y geht mit einer Emissionswahrscheinlichkeit von 99,98% direkt in den Grundzustand des stabilen ^{90}Zr über, sodass kaum messbare γ -Strahlung beim Übergang entsteht [18]. In der Nuklearmedizin wird ^{90}Y beispielsweise in der Therapie von Lebertumoren und der Radiosynoviorthese (RSO) eingesetzt.

Tab. 2.1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Radionuklide und ihren Zerfalleigenschaften. Für die α -Emitter ist die gesamte Energie des Mutternuklids sowie allen Tochternukliden der Zerfallskette angegeben. Für die β -Emitter ist die maximale β -Energie (max.) und das gewichtete Mittel über alle mittleren β -Energien (avg.) aufgeführt. Der bei der Angabe der Halbwertszeiten in den Klammern aufgeführte Wert entspricht der Unsicherheit der letzten angegebenen Ziffer(n).

Nuklid	Halbwertszeit T	Hauptzerfallsart	Energie	Referenz
^{223}Ra	11,43(3) d	α	ca. 28 MeV	[16]
^{224}Ra	3,631(2) d	α	ca. 26 MeV	[17]
^{177}Lu	6,647(4) d	β^-	max.: 498,3 keV; avg.: 134,1 keV	[17]
^{90}Y	2,6684(13) d	β^-	max.: 2278,7 keV; avg.: 926,6 keV	[18]
^{68}Ga	67,83(20) min	β^+	max.: 1899,1 keV; avg.: 829,5 keV	[19]
^{99m}Tc	6,0067(10) h	γ	140,5 keV	[20]

Als Beispiel für einen hochenergetischen β^+ -Emitter wird ^{68}Ga verwendet. ^{68}Ga zerfällt mit einer Halbwertszeit von 67,83 min unter Positronenemission (88,88%) und Elektroneneinfang (11,11%) in das stabile ^{68}Zn [19]. Es wird in der nuklearmedizinischen Diagnostik in der PET eingesetzt und kann dazu beispielsweise mit DOTATATE/DOTATOC oder PSMA markiert werden. Das in der konventionellen nuklearmedizinischen Diagnostik am häufigsten verwendete Nuklid ^{99m}Tc wird in dieser Arbeit als Beispiel für einen γ -Emitter eingesetzt. Der Übergang von dem metastabilen ersten angeregten Zustand in den Grundzustand ^{99}Tc findet mit einer Halbwertszeit von 6,0067 h unter Emission von γ -Quanten mit 140,5 keV statt [20].

Aufgrund ihrer kurzen Reichweite und ihres hohen Ionisationsvermögens besteht steigendes Interesse an dem Einsatz von α -emittierenden Nukliden für die nuklearmedizinische Therapie. Um DNA-Schäden nach Bestrahlung mit α -Emittieren zu untersuchen, werden im Rahmen dieser Arbeit die beiden Radiumisotope ^{223}Ra und ^{224}Ra verwendet. [^{223}Ra]RaCl₂ ist der erste α -Emitter, der zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem kastrationsresistentem Prostatakarzinom zugelassen wurde [21, 22]. Der α -Emitter [^{224}Ra]RaCl₂ wurde in der Vergangenheit zur Schmerztherapie bei Morbus Bechterew verabreicht. Aufgrund des erhöhten Risikos der Entwicklung bösartiger Erkrankungen nach der Injektion von [^{224}Ra]RaCl₂ wurde die klinische Verwendung dieses Nuklids im Jahr 2005 in Deutschland eingestellt [23, 24]. In den letzten Jahren entstand jedoch erneutes Interesse an dem Gebrauch von ^{224}Ra für klinische Anwendungen: Westrom *et al.* untersuchten die Verwendung von ^{224}Ra -beschichteten Mikropartikeln zur lokalisierten internen α -Therapie bei Mäusen [25, 26]. Darüber hinaus zeigten Juzeniene *et al.* in einem Mausmodell, dass ^{224}Ra ein vielversprechender Kandidat für die Behandlung von Knochenmetastasen bei Brustkrebs ist [27].

Im Gegensatz zu den verwendeten β - und γ -emittierenden Nukliden findet beim Zerfall von ^{223}Ra und ^{224}Ra keine direkte Umwandlung in ein stabiles Tochternuklid statt, sodass Zerfallsketten entstehen. ^{223}Ra zerfällt in sechs Stufen in das stabile Nuklid ^{207}Pb , wie in Abbildung 2.1A schematisch dargestellt. Vier der Töchter (^{219}Rn , ^{215}Po , ^{211}Bi und ^{211}Po) sind ebenfalls α -Emitter, wobei der Zerfall von ^{211}Bi in ^{211}Po mit einer Ausbeute von 0,3% vernachlässigt werden kann. Unter Vernachlässigung dieses Zweigs werden pro Zerfall insgesamt vier α -Teilchen mit Energien zwischen 5,77 MeV (^{223}Ra) und 7,49 MeV (^{215}Po) pro Zerfall emittiert [28].

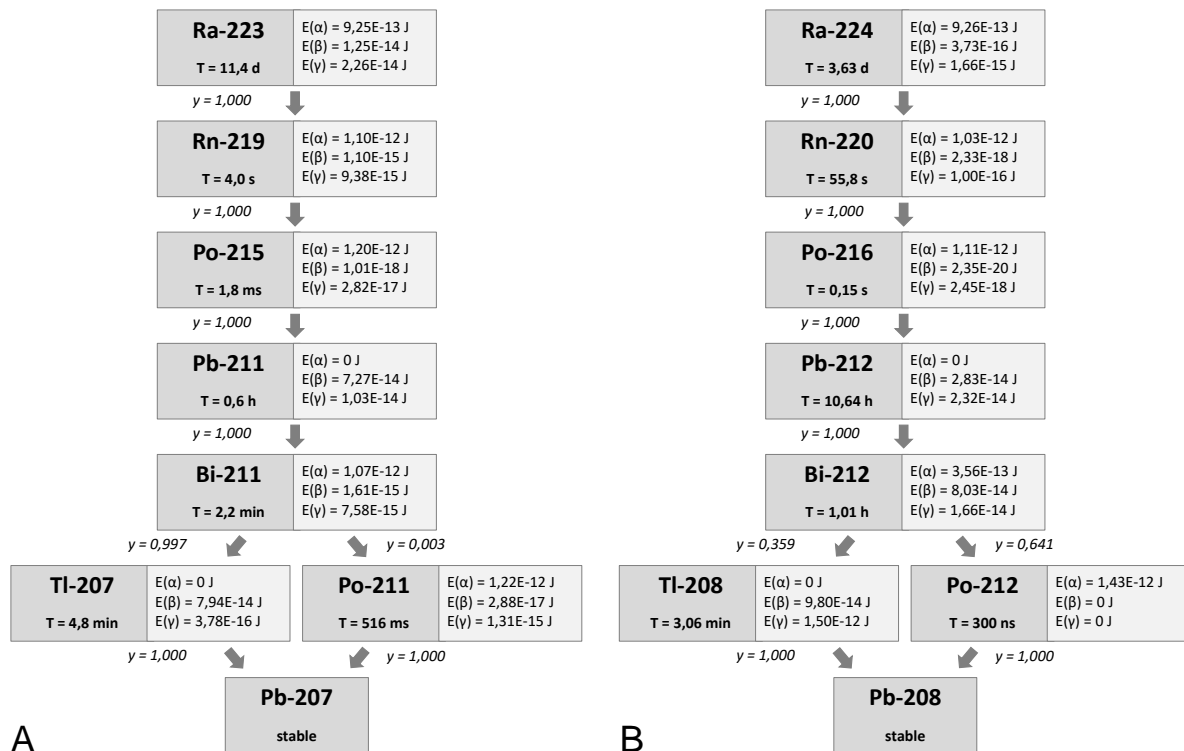


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Zerfallsketten der Nuklide ^{223}Ra (A) und ^{224}Ra (B) mit Angaben zu den Halbwertszeiten und Übergangsenergien (aus [29]). $E(\alpha)$ gibt die Energie der α -Teilchen und Rückstoßkerne pro Übergang an, $E(\beta)$ die der β -Teilchen, Konversionselektronen und Auger-Elektronen und $E(\gamma)$ die der γ - und Röntgenstrahlung. Mit y ist die Übergangswahrscheinlichkeit („yield“) des jeweiligen Übergangs bezeichnet. Nach [28, 30].

^{224}Ra zerfällt ebenfalls in sechs Stufen in das stabile Nuklid ^{208}Pb , wie in Abbildung 2.1B schematisch dargestellt. Vier der Töchter (^{220}Rn , ^{216}Po , ^{212}Bi und ^{212}Po) sind α -Emitter, sodass insgesamt pro Zerfall vier α -Teilchen mit Energien zwischen 5,30 MeV (^{212}Bi) und 10,55 MeV (^{212}Po) emittiert werden [30].

2.3 Aktivitätsbestimmung

2.3.1 Überblick

Für die Dosimetrie in der Nuklearmedizin ist die Kenntnis der Aktivitätsverteilung im Körper beziehungsweise ihres zeitlichen Verlaufs von entscheidender Bedeutung. Zur Berechnung der Energiedosis im Blut muss insbesondere die Aktivitätskonzentration im Blut bestimmt werden, jedoch auch die Aktivität im restlichen Körper, wenn davon ausgegangen werden kann, dass dieser auch zur Bestrahlung des Blutes beiträgt.

Das Vorgehen zur Bestimmung der Aktivität im Blut wird in Abschnitt 2.3.2 beschrieben und ist im Wesentlichen für alle verwendeten Nuklide gleich und unabhängig davon, ob die Bestrahlung des Blutes *in vivo* oder *ex vivo* erfolgt. Die Bestimmung der Aktivität im restlichen Körper

(Ganzkörper) ist nur für die Patientenstudien von Bedeutung und die entsprechende Methodik wird in Abschnitt 2.3.3 erläutert.

2.3.2 Bestimmung der Aktivität im Blut

Eine Möglichkeit zur Quantifizierung der Aktivität in einer Probe bietet die Auswertung nuklid-spezifischer Gammaspektren (siehe Abschnitt 2.2.4). Zur Bestimmung der genauen Aktivitätskonzentration im Blut wird aus jeder bestrahlten Blutprobe eine Messprobe von 100 μl bis maximal 1 ml entnommen und durch Gammaspektroskopie in einem Germanium-Detektor (Canberra) mit bekannter und durch auf meteorologische Institute zurückführbare Standards überprüfter Zähleffizienz ausgewertet.

Bei den verwendeten α -Emittlern ^{223}Ra und ^{224}Ra wird durch die Auswertung mehrerer, von unterschiedlichen Tochternukliden stammender γ -Linien zusätzlich überprüft, ob sich das Mutternuklid im radioaktiven Gleichgewicht mit den Tochternukliden befindet. Bei den verwendeten β - und γ -Emittlern wird jeweils eine γ -Linie ausgewertet. Eine Liste der γ -Linien, die zur Aktivitätsbestimmung ausgewertet werden, ist in Tabelle 2.2 gegeben.

Tab. 2.2: Übersicht der nuklidspezifischen γ -Linien, die zur Aktivitätsbestimmung ausgewertet werden.

Mutternuklid	γ -Linie	Emissionswahrscheinlichkeit p	Nuklid	Referenz
^{223}Ra	269,5 keV	14,23%	^{223}Ra	[16]
	271,2 keV	11,07%	^{219}Rn	[16]
	351,0 keV	13,00%	^{211}Bi	[31]
^{224}Ra	241,0 keV	4,12%	^{224}Ra	[17]
	238,6 keV	43,6%	^{212}Pb	[17]
	300,1 keV	3,18%	^{212}Pb	[17]
	727,3 keV	6,65%	^{212}Bi	[17]
^{177}Lu	208,4 keV	10,38%	^{177}Lu	[17]
^{90}Y	511 keV	$6,38 \cdot 10^{-3}\%$	^{90}Y	[18]
^{68}Ga	511 keV	177,8%	^{68}Ga	[19]
^{99m}Tc	140,5 keV	88,5%	^{99m}Tc	[20]

In Abbildung 2.2 ist ein Gammaspektrum für jedes der verwendeten Nuklide gezeigt. Zur besseren Vergleichbarkeit ist jeweils der Energiebereich von 100 keV bis etwa 550 keV dargestellt. Die Linie bei 727,3 keV im ^{224}Ra -Spektrum ist daher in dieser Abbildung nicht erkennbar.

Ein Sonderfall in der Aktivitätsbestimmung stellt ^{90}Y dar, da es sich hierbei um einen nahezu reinen β^- -Emitter handelt, der ein ausgeprägtes Bremsstrahlungsspektrum und kaum detektierbare γ -Emissionen aufweist. Mit einer Wahrscheinlichkeit von $3,19 \cdot 10^{-3}\%$ findet jedoch Innere Paarbildung statt. Die Vernichtungsstrahlung der gebildeten Elektron-Positron-Paare führt zu einer schwachen γ -Linie bei 511 keV, die zur Quantifizierung der Aktivität ausgewertet werden kann (siehe Abbildung 2.2D). Aufgrund der geringen Emissionswahrscheinlichkeit ist eine zuverlässige Quantifizierung der relativ geringen Aktivität in den einzelnen Messproben ($< 200 \text{ kBq}$) jedoch

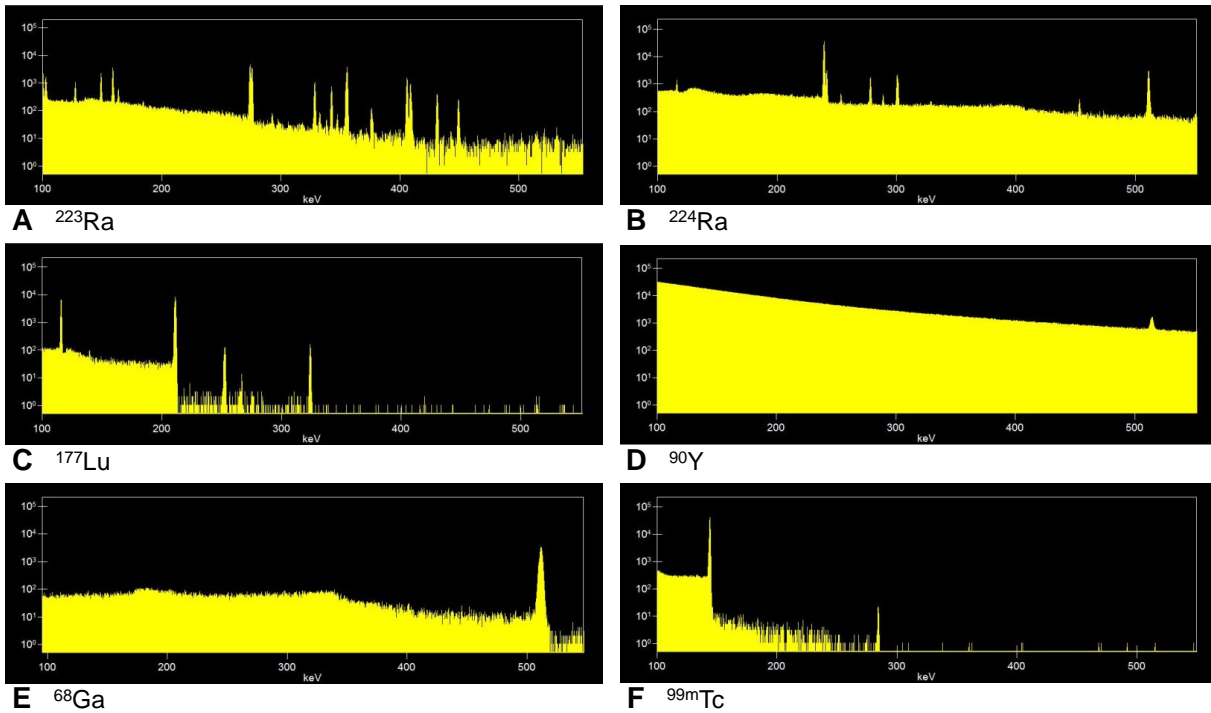


Abb. 2.2: Gammaspektren der verwendeten Radionuklide ²²³Ra (A), ²²⁴Ra (B), ¹⁷⁷Lu (C), ⁹⁰Y (D), ⁶⁸Ga (E) und ^{99m}Tc (F). Gezeigt ist jeweils ein Ausschnitt des Energiebereichs von 100 keV bis etwa 550 keV.

nicht möglich. Stattdessen wird ein Teil der ⁹⁰Y-Stammlösung, die zur Bestrahlung der Blutproben hergestellt wird, vorab im Germanium-Detektor gemessen und die Aktivitätskonzentration bestimmt. Anhand des zugegebenen Volumens kann daraus die Aktivitätskonzentration im Blut berechnet werden.

Generell kann aus der Anzahl der während der Messdauer t_M vom Detektor im entsprechenden, vorab definierten Energiefenster registrierten Ereignisse (Impulse) die Aktivität A wie folgt berechnet werden:

$$A = \text{Anzahl der Impulse} \cdot \frac{\ln 2}{T} \cdot \frac{1}{1 - \exp\left(-\frac{\ln 2}{T} \cdot t_M\right)} \cdot \frac{1}{\eta \cdot p \cdot y} \quad (2.13)$$

Dabei ist η die energieabhängige Detektoreffizienz, p die Emissionswahrscheinlichkeit und y die Übergangswahrscheinlichkeit. Die Anzahl der Impulse wird zuvor um den Untergrund korrigiert.

Um die Aktivitätskonzentration pro Milliliter Blut A^* zum Zeitpunkt der Blutentnahme (bei Patientenstudien) oder der Aktivitätszugabe (bei *Ex-vivo*-Studien) zu ermitteln, muss A durch das jeweilige Messvolumen V geteilt werden und eine Zerfallskorrektur um die Zeitdifferenz Δt zwischen Blutentnahme beziehungsweise Aktivitätszugabe erfolgen:

$$A^* = \frac{A}{V} \cdot \exp\left(\frac{\ln(2)}{T} \cdot \Delta t\right) \quad (2.14)$$

Während sich die Aktivitätskonzentration im Blut bei Bestrahlungen *ex vivo* nur durch den physikalischen Zerfall ändert, beeinflussen *in vivo* zusätzlich biologische Prozesse ihren zeitlichen Verlauf.

Bei Patientenstudien wird die auf die Blutentnahme-Zeitpunkte korrigierte Aktivitätskonzentration daher über die Zeit nach Verabreichung des Radiopharmakons aufgetragen, und somit werden Zeit-Aktivitäts-Kurven erstellt.

2.3.3 Bestimmung der Aktivität im Ganzkörper

Zur Erstellung der Zeit-Aktivitäts-Kurven des Ganzkörpers wird die Dosisleistung mithilfe einer Messsonde in einem festgelegten Abstand zum Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. In der Therapiestation ist dafür eine Messsonde (automess – Automation und Messtechnik GmbH) 2,5 m oberhalb des Patientenbetts angebracht, mit der bei jedem stationär aufgenommenen Patienten (zum Beispiel während Therapie mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA) regelmäßig Messungen durchgeführt werden. Bei Patienten, bei welchen die Verabreichung des Radiopharmakons für eine ambulant durchgeführte Untersuchung erfolgt (zum Beispiel Diagnostik mit [⁶⁸Ga]Ga-PSMA), wird ein Abstandshalter an die Messsonde (6150AD®, automess – Automation und Messtechnik GmbH) angebracht, sodass die Dosisleistung auf Höhe der Körpermitte genau im Abstand von 1 m gemessen werden kann. In beiden Fällen wird für den ersten Messwert jedes Patienten, der kurz nach Verabreichung des Radiopharmakons erhalten wird, eine Zerfallskorrektur auf den Zeitpunkt der Verabreichung durchgeführt und dieser Wert dann auf 1 gesetzt, was einer Aktivitätsaufnahme von 100% entspricht. Damit werden alle weiteren Messwerte normiert.

Zur Therapiekontrolle, wie beispielsweise während der Therapie mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA, werden zudem Ganzkörper-Aufnahmen mit der Gammakamera gemacht. Diese werden für die Erstellung der Zeit-Aktivitätskurven des Ganzkörpers zusätzlich ausgewertet. Dazu wird in jeder Aufnahme eine Kontur um den Körper des Patienten gezeichnet und die darin enthaltenen Impulse ausgewertet. Aus den hintergrundkorrigierten anterior und posterior gemessenen Zählraten wird dann das geometrische Mittel gebildet, um somit die Tiefenabhängigkeit der Aktivitätsverteilung näherungsweise zu korrigieren. Zur Kombination mit den Dosisleistungsmessungen, wird die gemittelte Zählrate zum ersten Messzeitpunkt dann auf den entsprechenden Wert der Dosisleistungsmessung normiert.

2.4 Berechnung der Energiedosis im Blut

2.4.1 Allgemeine Berechnung der Energiedosis

Die Energiedosis ist definiert als die mittlere Strahlungsenergie, die pro Materiemenge absorbiert wird. Sie wird in der Einheit Gray angegeben ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J kg}^{-1}$) [32].

Zur Bestimmung der Energiedosis wird der von der Arbeitsgruppe „Medical Internal Radiation Dose“ entwickelte MIRD-Formalismus angewendet [33, 34]. Demnach ist die Energiedosis in einer Zielregion r_T abhängig von der Größe und Lage der Zielregion und der Quellenregionen r_S , aus welchen radioaktive Strahlung emittiert wird, von der verabreichten Aktivität A_0 , von den physikalischen und chemischen Eigenschaften des Radiopharmakons und von dessen Biokinetik im Körper. Zur Berechnung der mittleren Energiedosis $D(r_T, T_D)$ bis zu einem bestimmten Zeitpunkt

T_D muss die zeitabhängige Rate der von allen relevanten Quellenregionen emittierten und in der Zielregion absorbierten Dosis bis T_D integriert werden:

$$D(r_T, T_D) = \int_0^{T_D} \sum_{r_S} A(r_S, t) S(r_T \leftarrow r_S) dt = \sum_{r_S} A_0 \tau_S(T_D) S(r_T \leftarrow r_S) \quad (2.15)$$

Hierbei bezeichnet $A(r_S, t)$ die zeitabhängige Aktivität in der Quellenregion. Durch die Integration über die Zeit erhält man die kumulierte Aktivität, das heißt die gesamte Anzahl der Zerfälle in r_S bis zum Zeitpunkt T_D . Diese lässt sich berechnen als Produkt der verabreichten Aktivität A_0 und des sogenannten „time-integrated activity coefficient“ τ_S (TIAC), der früher auch Residenzzeit genannt wurde. Der sogenannte S-Wert $S(r_T \leftarrow r_S)$ bezeichnet die mittlere Energiedosis im Zielorgan pro Zerfall im Quellenorgan und fasst die physikalischen Eigenschaften des Radiopharmakons sowie die geometrische Anordnung von r_S und r_T zusammen:

$$S(r_T \leftarrow r_S) = \frac{1}{M(r_T)} \sum_i E_i Y_i \phi(r_T \leftarrow r_S, E_i) \quad (2.16)$$

Hierbei ist $M(r_T)$ die Masse der Zielregion. E_i bezeichnet die mittlere Energie des i -ten Übergangs und Y_i die entsprechende Übergangswahrscheinlichkeit. $\phi(r_T \leftarrow r_S, E_i)$ ist der Anteil der aus der Quellenregion emittierten Energie, die im Zielorgan absorbiert wird. Eine mögliche Zeitabhängigkeit des S-Wertes kann unter der Annahme, dass Größe, Masse und Lage der Quellenregionen und der Zielregionen konstant bleiben, vernachlässigt werden.

Zur besseren Übersicht wird im Folgenden die Schreibweise $D_{r_T}(T_D)$ anstatt $D(r_T, T_D)$ sowie $S_{r_T \leftarrow r_S}$ anstatt $S(r_T \leftarrow r_S)$ verwendet.

2.4.2 Blutbasierte Dosimetrie

Da in dieser Arbeit die Berechnung der Energiedosis im Blut im Vordergrund steht, soll in diesem Abschnitt auf die Anpassung von Gleichung 2.15 für die Zielregion $r_T = \text{Blut}$ eingegangen werden. Für die Berechnung der Energiedosis im Blut müssen zwei Komponenten berücksichtigt werden: Die erste Komponente ist die lokale Selbstbestrahlung des Blutes ($r_S = r_T = \text{Blut}$), die hauptsächlich durch kurzreichweitige Strahlung erfolgt. Die zweite Komponente ist die Bestrahlung des Blutes durch die als homogen verteilt angenommene Aktivität im Ganzkörper (GK), das heißt im restlichen Körper ($r_S = \text{GK}$), die hauptsächlich durch langreichweitige γ -Strahlung erfolgt. Damit lässt sich Gleichung 2.15 vereinfachen zu:

$$D_{\text{Blut}}(T_D) = A_0 \cdot (\tau_{\text{Blut}}(T_D) \cdot S_{\text{Blut} \leftarrow \text{Blut}} + \tau_{\text{GK}}(T_D) \cdot S_{\text{Blut} \leftarrow \text{GK}}) \quad (2.17)$$

Zur Berechnung von $S_{\text{Blut} \leftarrow \text{Blut}}$ kann angenommen werden, dass die gesamte Energie der α - beziehungsweise β -Strahlung im Blut deponiert wird, während der Beitrag der γ -Strahlung aufgrund der geringen Wechselwirkungswahrscheinlichkeit im betrachteten Blutvolumen vernachlässigt werden kann. Zur Berechnung des S-Wertes für den Ganzkörper hingegen wird ausschließlich die γ -Komponente berücksichtigt und es kann von der Näherung $S_{\text{Blut} \leftarrow \text{GK}} \approx S_{\text{GK} \leftarrow \text{GK}}$ ausgegangen werden. Zusätzlich kann unter Verwendung der in OLINDA/EXM [35] hinterlegten S-Werte eine Anpassung auf das Gewicht des Patienten (w) vorgenommen werden, sodass gilt:

$$S_{\text{Blut} \leftarrow \text{GK}} = \frac{S_{\text{GK} \leftarrow \text{GK}}}{wt^{2/3}} \quad (2.18)$$

Die Bestimmung der TIACs τ_{Blut} und τ_{GK} erfolgt mithilfe von Zeit-Aktivitäts-Kurven für das Blut und den Ganzkörper. Es ist zu beachten, dass sich τ_{Blut} auf einen Milliliter Blut bezieht und die Einheit daher h ml^{-1} ist, während τ_{GK} in der Einheit h angegeben wird. Zur Erstellung der Zeit-Aktivitäts-Kurven des Blutes wird die Aktivität in zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommenen Blutproben mithilfe eines Germanium-Detektors bestimmt (siehe Abschnitt 2.3.2). Zur Bestimmung des Aktivitätsverlaufs im Ganzkörper werden Messungen der Dosisleistung, teilweise in Kombination mit Gammakameramessungen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt (siehe Abschnitt 2.3.3). Der zeitliche Verlauf der Aktivitätskurven des Blutes und des Ganzkörpers lässt sich durch eine Summe von Exponentialfunktionen beschreiben und es folgt demnach eine mono- ($n = 1$), bi- ($n = 2$) oder tri- ($n = 3$) exponentielle Kurvenanpassung

$$\frac{A(t)}{A_0} = \sum_{i=1}^n a_i \exp(-\lambda_i t) \quad (2.19)$$

mit den Fitparametern a_i und λ_i . Die Zerfallsrate λ_i beinhaltet den physikalischen und den biologischen Zerfall, das heißt $\lambda_i = \lambda_{\text{phys}} + \lambda_{i,\text{biol}}$. Zur Bestimmung der TIACs muss Gleichung 2.19 über die Zeit von $t = 0$ bis $t = T_D$ integriert werden:

$$\tau(T_D) = \sum_{i=1}^n \frac{a_i}{\lambda_i} (1 - \exp(-\lambda_i T_D)) \quad (2.20)$$

Wird das Blut nicht im Körper, sondern *ex vivo* bestrahlt, entfällt die zweite Komponente aus Gleichung 2.17, die den Ganzkörper-Anteil beschreibt, und es muss nur die Selbstbestrahlung des Blutes während der Inkubationsdauer T_I berücksichtigt werden. Der TIAC $\tau_{\text{Blut}}(T_I)$ reduziert sich in diesem Fall auf den (monoexponentiellen) physikalischen Zerfall des Radionuklids. Es gilt somit:

$$D_{\text{Blut}}(T_I) = A_0 \cdot \tau_{\text{Blut}}(T_I) \cdot S_{\text{Blut} \leftarrow \text{Blut}} = A^* \cdot d_{\text{Blut}}(T_I) \quad (2.21)$$

Hierbei ist A^* die nach Gleichung 2.14 berechnete Aktivitätskonzentration in der *ex vivo* bestrahlten Blutprobe. Der Dosiskoeffizient $d_{\text{Blut}}(T_I)$ ist definiert als:

$$d_{\text{Blut}}(T_I) = \frac{1}{\lambda} \cdot (1 - \exp(-\lambda T_I)) \cdot S_{\text{Blut} \leftarrow \text{Blut}} \quad (2.22)$$

Die Zerfallskonstante $\lambda = \lambda_{\text{phys}}$ bezieht sich in diesem Fall auf den physikalischen Zerfall.

2.5 Biologische Dosimetrie

2.5.1 Biomarker zum Nachweis von ionisierender Strahlung

Ergänzend zur physikalischen Dosimetrie kann die biologische Dosimetrie einen wichtigen Beitrag zum Strahlenschutz, zur Risikobewertung und vor allem zum besseren Verständnis der Wirkung von ionisierender Strahlung auf Zellen und Organismen leisten. Darüber hinaus können damit auch Unterschiede in der individuellen Strahlenempfindlichkeit erforscht werden [36]. Für die biologische Dosimetrie werden Proben auf bestimmte biologische Marker untersucht, welche sich zum Nachweis von Strahlenexpositionen und zur Quantifizierung von Strahlenschäden eignen.

Es gibt eine Vielzahl an biologischen Proben, die sich für die Analyse von Biomarkern eignen [37]. Sehr häufig werden jedoch PBMCs und insbesondere die darin enthaltenen Lymphozyten untersucht, da diese verhältnismäßig einfach durch Blutentnahmen gewonnen werden können. Ein weiterer Vorteil in der Verwendung von Lymphozyten liegt darin, dass sie sich in der G_0 -Phase des Zellzyklus befinden und Zellzykluseffekte daher nicht gesondert berücksichtigt werden müssen [15, 36].

Außerdem gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichen Biomarkern zum Nachweis von ionisierender Strahlung. Häufig werden zytogenetische Biomarker eingesetzt, die sich auf Chromosomenveränderungen im Zellkern beziehen [37, 38]. Aufgrund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität werden einige zytogenetische Endpunkte routinemäßig untersucht, um Strahlenexpositionen nachzuweisen [37]. Als Goldstandard in der biologischen Dosimetrie gilt die Analyse dizentrischer Chromosomen. Dizentrische Chromosomen besitzen im Gegensatz zu unbeschädigten Chromosomen zwei Zentromere und werden fast ausschließlich durch ionisierende Strahlung induziert. In sich nicht teilenden Zellen (wie beispielsweise Lymphozyten) sind sie beständig, ihre Anzahl nimmt jedoch mit dem Zellaustausch ab [37]. Für länger zurückliegende Expositionen eignen sich Translokationen als Biomarker, da sie auch Jahre nach einer Strahlenexposition in den Lymphozyten des peripheren Blutes nachgewiesen werden können [37]. Eine Translokation liegt vor, wenn ein gebrochener Chromosomenabschnitt mit einem anderen Chromosomenstück fusioniert. Diese Umlagerungen können beispielsweise durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) als Farbsprünge sichtbar gemacht und analysiert werden [38]. FISH mit verschiedenen Farbstoffen ermöglicht außerdem den Nachweis von komplexen Chromosomenaberrationen, die mindestens drei Chromosomenbrüche in zwei oder mehr Chromosomen beinhalten und als Kombination von mehreren einfachen Aberrationen (wie beispielsweise dizentrische Anordnungen und Translokationen) beschrieben werden können [37]. Ein weiterer häufig verwendeter zytogenetischer Biomarker sind Mikrokerne. Mikrokerne bilden sich, wenn ganze Chromosomen oder Chromosomenfragmente nach der Zellteilung im Zytoplasma verbleiben und nicht in den Zellkern der Tochterzelle aufgenommen werden [37, 38]. Im Vergleich zu den anderen genannten Techniken ist die Analyse von Mikrokerneln zwar im Allgemeinen mit weniger Aufwand verbunden, der Biomarker weist jedoch eine geringere Spezifität und Sensitivität für ionisierende Strahlung auf [37]. Generell lassen sich mit den genannten zytogenetischen Biomarkern nur Strahlenexpositionen in einem Dosisbereich > 100 mGy zuverlässig nachweisen [37]. Ein Biomarker, der in den letzten Jahren zunehmend auch insbesondere für die Untersuchung von Strahlenschäden nach Niedrigdosisbestrahlung < 100 mGy eingesetzt wurde, ist γ -H2AX [39–41]. γ -H2AX wird in Kombination mit dem Biomarker 53BP1 auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Im folgenden Abschnitt werden diese, auf DNA-Schäden bezogene Biomarker daher ausführlicher diskutiert.

2.5.2 γ -H2AX und 53BP1 als Biomarker für DNA-Schäden

Ionisierende Strahlung kann sowohl direkt als auch indirekt über reaktive Sauerstoffspezies (ROS für engl. „reactive oxygen species“) unterschiedliche Arten von DNA-Schäden verursachen [37]. Dazu gehören Basenschäden, Einzelstrangbrüche und Doppelstrangbrüche. Hierbei gehören Doppelstrangbrüche zu den kritischsten DNA-Schäden, da ihre Reparatur schwierig ist und teilweise fehlerhaft sein kann oder gar nicht durchgeführt werden kann. Unter allen DNA-Schäden haben

Doppelstrangbrüche daher die höchste Wahrscheinlichkeit Mutationen, Chromosomenschäden oder auch den Zelltod zu induzieren [42]. Die Anzahl der entstehenden Doppelstrangbrüche nach einer Bestrahlung mit 1 Gy γ -Strahlung wird auf ca. 40 geschätzt [37, 43]. Bei der Verwendung von auf DNA-Schäden bezogenen Biomarkern muss jedoch beachtet werden, dass die Entstehung von DNA-Schäden nicht spezifisch mit ionisierender Strahlung zusammenhängt, sondern durch viele Faktoren beeinflusst wird [37].

Direkt nach der Entstehung eines Doppelstrangbruchs wird das Histon H2AX an Serin 139 phosphoryliert. Die phosphorylierte Form von H2AX, die erstmalig nach Bestrahlung mit γ -Strahlung nachgewiesen werden konnte, wird γ -H2AX genannt [6]. Durch Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie lässt sich das den Doppelstrangbruch umgebende γ -H2AX als Focus sichtbar machen. Da die Anzahl der entstehenden Foci im Dosisbereich < 1 Gy proportional zur Anzahl der Doppelstrangbrüche ist, ist durch Zählen der Foci ein quantitativer Nachweis möglich [44–46]. Die Bildung des γ -H2AX setzt bereits 1 min nach einer Bestrahlung ein und erreicht nach 10 min bis 60 min ihr Maximum [37, 44, 47]. Anschließend ist ein Rückgang der Anzahl der Foci zu beobachten, der mit der Reparatur der Doppelstrangbrüche zusammenhängt [48, 49]. Dosisabschätzungen und der Nachweis von Strahlenexpositionen mittels des γ -H2AX-Assays sind daher nur möglich, wenn Zeitpunkt der Exposition bekannt ist und nur maximal einige Stunden zurückliegt. Durch die Analyse des zeitlichen Verlaufs der γ -H2AX-Foci kann jedoch auch die DNA-Reparatur und die individuelle Strahlenempfindlichkeit untersucht werden [37, 38]. Der Rückgang der Foci als Funktion der Zeit nach der Bestrahlung kann als zweiphasiger Prozess durch eine biexponentielle Funktion beschrieben werden, wie Horn *et al.* und Mariotti *et al.* für mit Röntgenstrahlung exponierte Lymphozyten beziehungsweise Fibroblasten zeigten [50, 51]. Die zwei Phasen bestehen aus einer schnellen und einer langsamen Komponente, was das Konzept unterstützt, dass Doppelstrangbrüche über einen schnellen und einen langsamen Signalweg repariert werden [50–52]. Eine weitere direkte zelluläre Antwort auf einen entstehenden Doppelstrangbruch ist die Anreicherung des Signalproteins 53BP1 an dem den Doppelstrangbruch umgebenden Chromatin [7]. Es wurde gezeigt, dass 53BP1 sehr verlässlich mit γ -H2AX kolokalisiert [5, 50, 51, 53]. Im Rahmen dieser Arbeit wird daher eine Kombination aus beiden Biomarkern verwendet und kolokalisierende Signale ausgewertet, um die Testgenauigkeit zu erhöhen [8].

Der γ -H2AX+53BP1-Assay wird in dieser Arbeit zum quantitativen Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen in PBMCs verwendet, die aus Blutproben von Patienten sowie gesunden Versuchspersonen isoliert werden. Auf das Vorgehen bei der Probenaufbereitung für den γ -H2AX+53BP1-Assay und die anschließende Auswertung wird im folgenden Abschnitt 2.5.3 eingegangen.

2.5.3 Probenaufbereitung für den γ -H2AX+53BP1-Assay

Separation der PBMCs und Immunfluoreszenzfärbung

Zur Separation der PBMCs, das heißt der Lymphozyten und Monozyten des Blutes, werden ca. 3 ml bis 4 ml Blut in BD Vacutainer® CPT™ Röhrchen pipettiert, die ein kombiniertes Dichtentrennsystem aus Ficoll und Gel enthalten (Abbildung 2.3A). Den Angaben des Herstellers entsprechend wird das Blut bei Raumtemperatur 20 min mit 1500 g zentrifugiert. Nach der Trennung werden die PBMCs in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One GmbH) überführt und

darin mit ca. 12 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend durch Zentrifugieren (10 min mit 400 g) sedimentiert. Dieser Waschschrift wird nach Abnahme des PBS-Überstands und Resuspension der Zellen ein zweites Mal wiederholt. Daraufhin wird der PBS-Überstand erneut verworfen und die Zellen in 300 µl PBS resuspendiert. Direkt im Anschluss erfolgt die Fixierung der Zellen durch Zugabe von 700 µl Ethanol (99%, unvergällt) bei 0 °C, sodass sich eine 70%ige Ethanollösung ergibt. Die fixierten PBMCs werden dann bei -20 °C aufbewahrt. Die Immunfluoreszenzfärbung und die Quantifizierung der Doppelstrangbrüche mittels des γ -H2AX+53BP1-Assays erfolgen durch den Kooperationspartner am Institut für Radiobiologie der Bundeswehr. Die fixierten Zellen werden dafür auf Eis in das Partnerinstitut nach München versendet. Dort wird zunächst die Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern für γ -H2AX und 53BP1 ausgeführt, analog zur durch Lassmann *et al.* beschriebenen Vorgehensweise [5]. Als primäre Antikörper werden mouse anti- γ -H2AX (Merck) und rabbit anti-53BP1 (Novus) verwendet. Als sekundäre Antikörper für die Detektion werden goat anti-mouse Alexa-488 (Morbitec) und donkey anti-rabbit Cy3 Fab (Dianova) verwendet [28]. Die DNA und damit die Zellkerne werden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt.

Quantifizierung der γ -H2AX+53BP1 Foci und Spuren

Die Quantifizierung der kolokalisierenden γ -H2AX+53BP1-Foci erfolgt manuell durch immer den selben erfahrenen Wissenschaftler unter Verwendung eines Zeiss Axioimager 2i Fluoreszenzmikroskops, das mit Einzelbandpassfluoreszenzfiltern und mit einem rot/grün Doppelbandpassfilter (AHF Analysentechnik) ausgestattet ist. Ein Ausschnitt eines typischen Mikroskopbildes ist in Abbildung 2.3B gezeigt. In den mit DAPI blau gefärbten Zellkernen sind γ -H2AX (grün) und

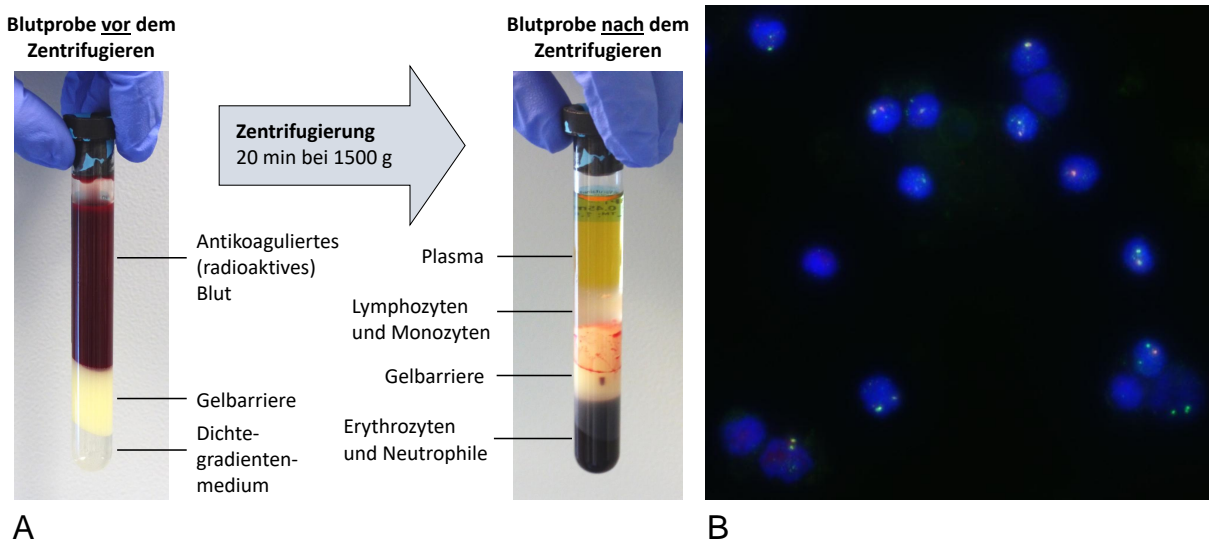


Abb. 2.3: **A:** Schematische Darstellung der Trennung der Blutbestandteile mithilfe des BD Vacutainer® CPT™ Systems. **B:** Ausschnitt eines Mikroskopbildes, in dem γ -H2AX (grün) und 53BP1 (rot) enthaltende Foci in den runden Zellkernen (blau) der PBMCs sichtbar sind. Kolokalisierende Foci erscheinen gelblich beziehungsweise orange. Die in diesem Beispiel abgebildeten Zellen stammen aus einer Blutprobe, die *ex vivo* mit ^{177}Lu bestrahlt wurde, resultierend in einer Energiedosis im Blut von 50 mGy.

53BP1 (rot) enthaltende Foci sichtbar, die bei Kolo-kalisierung gelblich beziehungsweise orange erscheinen. Die abgebildeten Zellen stammen aus einer Blutprobe, die *ex vivo* mit ^{177}Lu bestrahlt wurde, resultierend in einer Energiedosis im Blut von 50 mGy. In der Regel werden 100 Zellen pro Probe analysiert. In wenigen Fällen werden bis zu 200 Zellen ausgewertet. Zellen mit geschädigter Morphologie werden von der Analyse ausgeschlossen.

Die Berechnung der Standardabweichung der durchschnittlichen Anzahl der Foci pro Zelle (SD_{Foci}) erfolgt unter Annahme einer Poissonverteilung:

$$SD_{\text{Foci}} = \frac{\sqrt{\text{Gesamtzahl der Foci}}}{\text{Anzahl der gezählten Zellen}} \quad (2.23)$$

Zur Berechnung der strahlungsinduzierten Foci (RIF für engl. „radiation-induced foci“) pro Zelle wird der individuelle Nullwert, das heißt die Anzahl der gezählten Foci in der jeweiligen unbestrahlten Probe, abgezogen. Zur Berechnung der Standardabweichung der Anzahl der RIF pro Zelle wird entsprechend eine Fehlerfortpflanzung durchgeführt.

Während in den mit β - und γ -Emittern bestrahlten Zellen ausschließlich einzeln verteilte Foci mit Durchmessern $\leq 1,1 \mu\text{m}$ erkennbar sind, können in den mit α -Emittern bestrahlten Zellen zusätzlich auch größere Foci mit Durchmessern $> 1,1 \mu\text{m}$ sowie dicht aneinander gereihete und teilweise nicht mehr einzeln auflösbare Foci detektiert werden [28]. Diese γ -H2AX+53BP1 enthaltenden Foci-Spuren kennzeichnen die DNA-Schäden, die entlang der Trajektorie von dicht ionisierenden Teilchen entstehen, wenn sie den Zellkern durchqueren [54, 55]. Sie werden im Folgenden als α -Spuren bezeichnet und in Abschnitt 3.3.1 genauer charakterisiert. Analog zum Vorgehen bei den mit β - und γ -Emittern bestrahlten Proben werden 100 Zellen pro Probe ausgewertet und die Standardabweichung der Anzahl der α -Spuren unter der Annahme einer Poissonverteilung analog zu Gleichung 2.23 berechnet.

2.6 Auswertung der Daten und statistische Analyse

Für die Datenanalyse und die graphische Darstellung der Daten wird die Software OriginPro (OriginLab Corporation) verwendet. Des Weiteren werden alle statistischen Analysen mit OriginPro durchgeführt.

Um Datensätze auf Normalverteilung zu prüfen, wird der Shapiro-Wilk-Test angewendet. Zum Test auf Korrelationen wird der Pearson'sche Korrelationskoeffizient r bestimmt, bei Normalverteilung und unter der Annahme eines linearen Zusammenhangs. Sind diese Voraussetzungen nicht erfüllt, wird der Spearman'sche Korrelationskoeffizient ρ verwendet. Um zu testen, ob zwei normalverteilte Datensätze signifikant unterschiedlich sind, werden t -Tests durchgeführt. Ist einer der Datensätze nicht normalverteilt, wird der Mann-Whitney-U-Test bei voneinander unabhängigen Stichproben und der Wilcoxon-Test bei gepaarten Stichproben angewendet.

Generell wird das Signifikanzniveau auf 5% gesetzt. Die Nullhypothese wird abgelehnt und Ergebnisse gelten als signifikant, wenn $p < 0,05$ gilt.

Allgemein, wenn nicht anders beschrieben, sind Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben. Liegt keine Normalverteilung vor, ist der Median, der minimale (min.) und der maximale (max.) Wert des Datensatzes aufgeführt. Bei aus Kurvenanpassungen resultierenden Fitparametern sind Standardfehler angegeben.

3 Dosisabhängige Induktion von DNA-Schäden nach interner *Ex-vivo*-Bestrahlung

3.1 Einleitung

Durch die interne Bestrahlung von Blutproben mit den Radionukliden ^{131}I und ^{177}Lu konnte bereits gezeigt werden, dass ein linearer Zusammenhang zwischen den strahlungsinduzierten γ -H2AX+53BP1-Foci und der Energiedosis im Blut besteht [9]. Diese *Ex-vivo*-Kalibrierkurve, die bisher nur für die beiden β^- -Emitter erstellt wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit auf weitere Radionuklide mit unterschiedlichen Emissionseigenschaften ausgeweitet werden.

Aufgrund des steigenden Interesses am Einsatz von α -Emittlern für die nuklearmedizinische Therapie sollte in dieser Arbeit insbesondere auch erstmalig eine Kalibrierkurve für α -Emitter erstellt werden. Die Ergebnisse dieser Teilstudie wurden 2018 in „Scientific Reports“ [28] und in „EJNMMI Research“ [30] veröffentlicht.

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchspersonen und Versuchsreihen

Für die Durchführung von *Ex-vivo*-Bestrahlungen wurden acht gesunden Versuchspersonen (V1-V8) ein- oder mehrmalig Blutproben entnommen. Eine Übersicht der demographischen Daten der Versuchspersonen ist in Tabelle 3.1 gegeben.

Insgesamt wurden 25 Versuchsreihen mit den in Abschnitt 2.2.5 charakterisierten Radionukliden durchgeführt. Tabelle 3.2 zeigt eine Übersicht der durchgeführten Versuchsreihen.

Tab. 3.1: Übersicht der demographischen Daten der Versuchspersonen. Da einigen Versuchspersonen mehrfach in einem Zeitraum von bis zu vier Jahren Blutproben entnommen wurden, sind teilweise Altersspannen angegeben.

Versuchsperson	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8
Geschlecht	m	m	f	f	f	f	m	m
Alter (a)	59-61	29-31	28-30	33-37	21-22	62	22	29

Tab. 3.2: Übersicht der durchgeführten Versuchsreihen.

Nuklid	Anzahl der Versuchsreihen	Versuchspersonen
^{223}Ra	6	V1, V4-8
^{224}Ra	3	V1, V4-5
^{177}Lu	4	V1-4
^{90}Y	4	V1-4
^{68}Ga	4	V1-4
^{99m}Tc	4	V1-4

3.2.2 *Ex-vivo*-Bestrahlung der Blutproben

Zur Bestrahlung *ex vivo* wurde den Versuchspersonen bis zu 30 ml Blut in Li-Heparin Blutentnahmeröhrchen (S-Monovette®, Sarstedt) entnommen und in sechs bis sieben Proben zu je 3,5 ml aufgeteilt. Für die Bestimmung des individuellen Nullwerts, das heißt der Anzahl an bereits ohne Strahlenexposition vorliegenden Foci, wurde jeweils eine Probe pro Versuchsperson unbestrahlt belassen und direkt aufbereitet. Den restlichen Proben wurde in 5 ml-Rundbodenröhrchen (Sarstedt) jeweils 1 ml in PBS verdünnte radioaktive Lösung mit unterschiedlichen Aktivitätskonzentrationen hinzugegeben. Die Aktivitätskonzentrationen wurden dabei so gewählt, dass Energiedosen im Blut zwischen 6 mGy und maximal 150 mGy erreicht wurden. Um eine gleichmäßige Bestrahlung der Blutproben zu gewährleisten, die mit der *In-vivo*-Bestrahlung nach Verabreichung von Radiopharmaka vergleichbar ist, folgte eine einstündige Inkubation ($T_I = 1$ h) der Proben bei 37 °C auf einem Rollenmischer. Direkt im Anschluss wurden 100 µl bis maximal 1 ml des Blutes als Messprobe zur Bestimmung der exakten Aktivitätskonzentration in ein weiteres 5 ml-Rundbodenröhrchen überführt und, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, im Germanium-Detektor gemessen, während der restliche Teil der Blutprobe, wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben, für die Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche mittels des γ -H2AX+53BP1-Assays aufbereitet wurde.

3.2.3 Berechnung der Energiedosis im Blut

Zunächst wurden Dosiskoeffizienten gemäß Gleichung 2.22 für $T_I = 1$ h für alle verwendeten Radionuklide bestimmt. Durch Multiplikation des entsprechenden Dosiskoeffizienten mit der nach Gleichungen 2.13 und 2.14 bestimmten Aktivität A^* pro Milliliter Blut zum Zeitpunkt der Entnahme erfolgte dann die Berechnung der Energiedosis im Blut gemäß Gleichung 2.21.

Die S-Werte $S_{\text{Blut} \leftarrow \text{Blut}}$ für die β - beziehungsweise γ -emittierenden Radionuklide ^{68}Ga , ^{177}Lu , ^{90}Y und ^{99m}Tc wurden dabei unter Verwendung der von Hänscheid *et al.* publizierten Daten [56] ermittelt. Hänscheid *et al.* verwendeten Monte-Carlo-Simulationen, um die Energiedeposition in Blutgefäßen unterschiedlicher Größe für einige in der Nuklearmedizin häufig eingesetzte Radionuklide zu berechnen. Ausgehend von den von Eckerman und Endo publizierten Zerfallsdaten [29] wurde dabei der Energiebeitrag aller Elektronen und aller Photonen separat berücksichtigt [56]. Für diese Arbeit wurden die Daten von Hänscheid *et al.* [56] auf die Geometrie des verwendeten Inkubationsröhrchens mit dem Innenradius $r = 4,75$ mm angepasst. Zur Ermittlung von $S_{\text{Blut} \leftarrow \text{Blut}}$

für die α -Emitter ^{223}Ra und ^{224}Ra wurde die Annahme gemacht, dass die Energie der emittierten Teilchen $E(\alpha)$ und $E(\beta)$ aller Zerfallsprodukte lokal deponiert wird, während die Energie der emittierten Photonen $E(\gamma)$ vernachlässigt werden kann (siehe Abbildung 2.1). Die Zerfallsdaten wurden ebenfalls den von Eckerman und Endo publizierten Tabellen [29] entnommen und der Anteil aller α -Teilchen und aller Elektronen wurde separat berücksichtigt.

Zur Abschätzung der Unsicherheit der Energiedosis im Blut δD_{Blut} wurde eine Fehlerfortpflanzung durchgeführt. Als unabhängige fehlerbehaftete Größen wurden dabei die Aktivität A , die Zeit zwischen der Zugabe der radioaktiven Lösung und der Messung im Germanium-Detektor Δt , das Messvolumen V und der Dosiskoeffizient d_{Blut} mit den jeweiligen Messunsicherheiten u_A , $u_{\Delta t}$, u_V und $u_{d_{\text{Blut}}}$ berücksichtigt.

$$\delta D_{\text{Blut}} = \sqrt{\left(\frac{\partial D_{\text{Blut}}}{\partial A}\right)^2 \cdot u_A^2 + \left(\frac{\partial D_{\text{Blut}}}{\partial \Delta t}\right)^2 \cdot u_{\Delta t}^2 + \left(\frac{\partial D_{\text{Blut}}}{\partial V}\right)^2 \cdot u_V^2 + \left(\frac{\partial D_{\text{Blut}}}{\partial d_{\text{Blut}}}\right)^2 \cdot u_{d_{\text{Blut}}}^2} \quad (3.1)$$

Die Abschätzung von u_A erfolgte aus der Anzahl der registrierten Impulse, unter Annahme einer Poissonstatistik. Wenn mehrere γ -Linien zur Quantifizierung der Aktivität ausgewertet wurden, wurde die Unsicherheit des Mittelwerts verwendet. Des Weiteren wurden $u_{\Delta t} = 1$ min und $u_V = 0,5 \mu\text{l}$ angenommen. Ein Wert für $u_{d_{\text{Blut}}}$ wurde nuklidspezifisch auf 1% bis 2% des entsprechenden Dosiskoeffizienten d_{Blut} abgeschätzt.

Eine Ausnahme bildete die Berechnung der Energiedosis bei den Testreihen mit ^{90}Y . Wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, konnte die Aktivitätskonzentration in diesem Sonderfall nicht direkt in den einzelnen Blutproben bestimmt werden. Für die mit ^{90}Y bestrahlten Blutproben wurde daher generell eine Unsicherheit von 10% für die Energiedosis im Blut angenommen.

Die berechneten Unsicherheiten sind in den Abbildungen in den folgenden Abschnitten als Fehlerbalken dargestellt und wurden für die linearen Anpassungen berücksichtigt.

3.2.4 γ -H2AX+53BP1-Assay

Die Probenaufbereitung für den γ -H2AX+53BP1-Assay und die Quantifizierung der Foci und Spuren erfolgte wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben. Zusätzlich wurde die Größe der runden Foci ermittelt. Dazu wurde pro Nuklid der Durchmesser von 100 bis 107 runden γ -H2AX+53BP1 enthaltenden Foci in digitalen RGB-Bildern, die in der Brennebene der Foci aufgenommen wurden, mit Hilfe der Funktionen „length measurement“ und „signal normalization“ des ISIS-Bildaufnahme-Systems (MetaSystems Hard & Software GmbH) bestimmt.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 γ -H2AX+53BP1 Foci und Spuren

Zur Quantifizierung der DNA-Schäden wurden, wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben, 100 Zellen pro Probe ausgewertet. Während in den mit β - und γ -Emitttern bestrahlten Zellen kleine, einzeln verteilte Foci sichtbar waren, waren in den mit α -Emitttern bestrahlten Zellen zusätzlich Foci-Spuren (α -Spuren) sowie größere Foci detektierbar (siehe Abschnitt 2.5.3). Abbildung 3.1 zeigt

eine zusammengestellte Übersicht von Zellkernen aus einer mit ^{223}Ra bestrahlten Probe mit unterschiedlichen Schadensgeometrien. Spuren von α -Teilchen sind in den beiden rechten Zellkernen zu erkennen. Die Verteilung der beiden Biomarker innerhalb der Spuren war häufig unterschiedlich; möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Chromatindichten. In seltenen Fällen war, mit Ausnahme eines schwachen Hintergrunds, kein 53BP1 in einzelnen Spuren enthalten, wie im Zellkern oben rechts im Bild. Diese Spuren zeigten oft eine breitere Verteilung des γ -H2AX verglichen zu den Spuren, die beide Biomarker enthielten. Ein großer Focus mit einem Durchmesser $> 1,1 \mu\text{m}$ ist im Zellkern in der Mitte (mit Pfeil) zu erkennen. Foci dieser Größe waren ausschließlich in mit α -Emittlern bestrahlten Zellen zu finden (Abbildung 3.2A), was darauf hindeutet, dass es hierbei um Spuren von α -Teilchen handelt, die senkrecht zur Bildebene verliefen. Sie wurden daher auch als α -Spuren gezählt. Kleine, runde Foci mit Durchmessern $\leq 1,1 \mu\text{m}$ wie in den Zellkernen in Abbildung 3.1 links oben (mit Pfeilspitzen) und in dem Ausschnitt links unten (gelb umrahmt), der Zellen aus einer mit ^{177}Lu bestrahlten Probe zeigt, waren hingegen in allen Proben zu erkennen (Abbildung 3.2A).

In den mit α -Emittlern bestrahlten Proben war im untersuchten Dosisbereich selten mehr als eine α -Spur pro Zelle detektierbar. In den mit ^{223}Ra bestrahlten Proben enthielten nur acht von 3000 Zellen zwei α -Spuren. In den mit β - oder γ -Emittlern bestrahlten Proben waren maximal 7 Foci in einer Zelle (in zwei von 9800 bestrahlten Zellen) detektierbar. Die Anzahl der Zellen, die einen Focus oder mehrere Foci enthielten, änderte sich in Abhängigkeit von der Energiedosis im Blut (Abbildung 3.2B). Während in den unbestrahlten Proben 81% der Zellen keine Foci zeigten, war dies nach Bestrahlung mit einer nominellen Energiedosis im Blut von 50 mGy in nur 41% der Zellen der Fall.

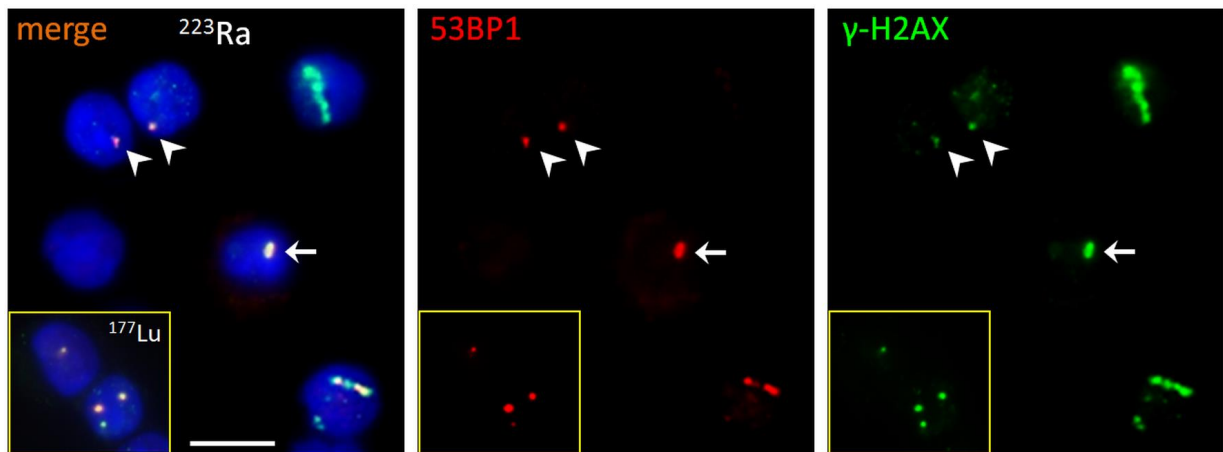


Abb. 3.1: Zusammengestellte Übersicht von Zellkernen (DAPI, blau) nach Bestrahlung mit ^{223}Ra mit α -Spuren (rechts), einem großen Focus (mittig, mit Pfeil) und kleinen Foci (links, mit Pfeilspitzen). Ausschließlich letztere sind auch in mit β - und γ -Emittlern bestrahlten Zellen zu beobachten, wie im gelb umrahmten Bereich unten links am Beispiel einer mit ^{177}Lu bestrahlten Probe gezeigt. Im linken Teil ist das überlagerte Bild aller Kanäle abgebildet, während in der Mitte nur der rote Kanal, der das 53BP1-Fluoreszenzsignal zeigt, und im rechten Teil nur der grüne Kanal, der das γ -H2AX-Fluoreszenzsignal zeigt, sichtbar sind. Der im linken Bild eingezeichnete Vergrößerungsbalken entspricht 10 μm . Aus [28].

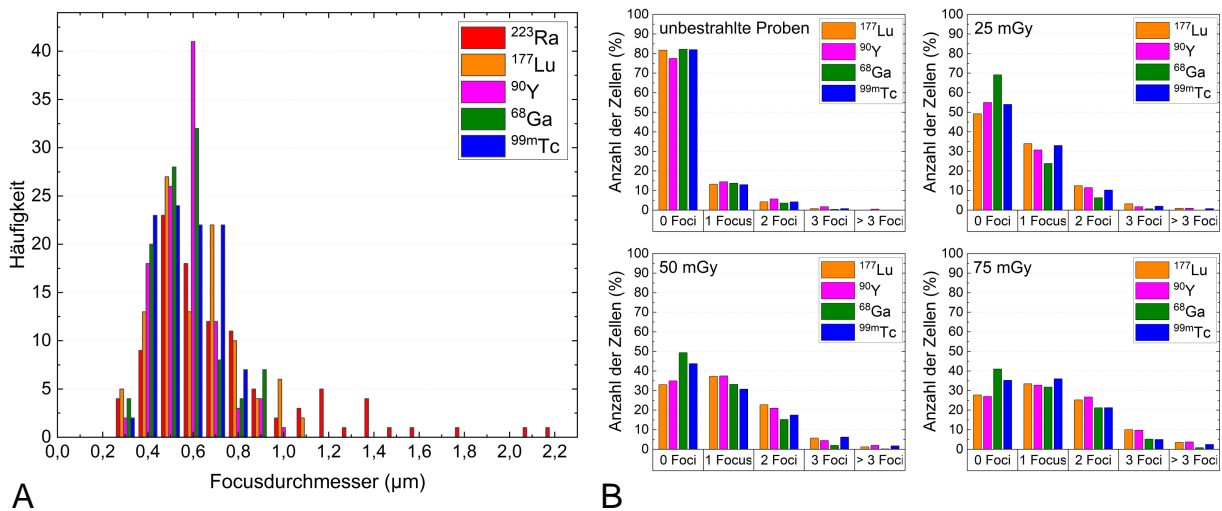


Abb. 3.2: Größe und Verteilung der γ -H2AX+53BP1 Foci. **A:** Häufigkeitsverteilung der Durchmesser der Foci nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Nukliden. Foci mit Durchmessern $> 1,1$ μm sind ausschließlich in den mit ^{223}Ra bestrahlten Proben zu finden, was darauf hindeutet, dass es sich hierbei um Spuren von α -Teilchen handelt, die senkrecht zur Bildebene verlaufen. **B:** Häufigkeitsverteilungen der Anzahl der Foci pro Zelle in Abhängigkeit des verwendeten β - oder γ -emittierenden Nuklids in den unbestrahlten Proben sowie nach Bestrahlung mit einer nominellen Energiedosis im Blut von 25 mGy, 50 mGy und 75 mGy.

Vereinzelt konnten geringfügige nuklidabhängige Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 3.2B), welche möglicherweise mit unterschiedlichen Abweichungen von der nominellen Energiedosis im Blut zusammenhängen.

3.3.2 Ex-vivo-Kalibrierkurve für β - und γ -Emitter

Für die β - beziehungsweise γ -Emitter ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{68}Ga und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ wurden die in Tabelle 3.3 aufgeführten S-Werte und Dosiskoeffizienten berechnet. Die berechneten Energiedosen im Blut betragen zwischen 5,47 mGy und 109,15 mGy in allen bestrahlten Proben.

Die durchschnittliche Anzahl an Foci pro Zelle in den unbestrahlten Proben betrug im Median

Tab. 3.3: S-Werte und Dosiskoeffizienten für die β - und γ -Emitter ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{68}Ga und $^{99\text{m}}\text{Tc}$, die unter Verwendung der von Hänscheid et al. publizierten Daten [56] für die Geometrie des Inkubationsröhrchens berechnet wurden.

Nuklid	$S_{\text{Blut} \leftarrow \text{Blut}}$ ($\text{Gy s}^{-1} \text{Bq}^{-1} \text{ml}$)			$d_{\text{Blut}}(1 \text{h})$ (mGy ml MBq^{-1})		
	Elektronen	Photonen	Gesamt	Elektronen	Photonen	Gesamt
^{177}Lu	$2,31 \cdot 10^{-11}$	$1,32 \cdot 10^{-13}$	$2,32 \cdot 10^{-11}$	82,87	0,47	83,34
^{90}Y	$1,02 \cdot 10^{-10}$	–	$1,02 \cdot 10^{-10}$	366,80	–	366,80
^{68}Ga	$8,95 \cdot 10^{-11}$	$2,99 \cdot 10^{-12}$	$9,25 \cdot 10^{-11}$	240,81	8,05	248,86
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	$2,58 \cdot 10^{-12}$	$4,18 \cdot 10^{-13}$	$3,00 \cdot 10^{-12}$	8,78	1,42	10,20

0,24 (min.: 0,14, max.: 0,58). Die individuellen Nullwerte der Versuchspersonen sind in Abbildung 3.3A dargestellt. Grundsätzlich glichen sich die Werte der jeweiligen Versuchsperson und waren nicht abhängig von der Versuchsreihe, das heißt dem Tag der Durchführung des Experiments. Eine Ausnahme bildete der zur ^{90}Y -Versuchsreihe gehörige Nullwert von Versuchsperson V4, der als Ausreißer gewertet werden kann. Da jedoch in allen Proben dieser Versuchsreihe überdurchschnittlich viele $\gamma\text{-H2AX}+53\text{BP1}$ -Foci detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass dies mit einer technischen Variation, zum Beispiel durch eine verhältnismäßig ausgeprägtere Immunfluoreszenzfärbung, zu erklären ist. Unter der Annahme, dass eine gleichmäßig erhöhte Immunfluoreszenzfärbung aller Proben innerhalb einer Versuchsreihe die durchschnittliche Anzahl der RIF pro Zelle nicht maßgeblich beeinflusst, wurde trotz des Ausreißers von einem Ausschluss dieser Versuchsreihe abgesehen.

Die durchschnittliche Anzahl an RIF pro Zelle in Abhängigkeit von der berechneten Energiedosis im Blut ist in Abbildung 3.3B gezeigt. In Übereinstimmung mit den veröffentlichten Daten von Eberlein *et al.* war ein linearer Anstieg der Anzahl der RIF mit steigender Energiedosis im Blut zu beobachten [9].

Um zu untersuchen, ob es nuklid- oder versuchspersonenspezifische Unterschiede in der dosisabhängigen Induktion der DNA-Doppelstrangbrüche gibt, wurden individuelle lineare Anpassungen für jede der 16 Versuchsreihen durchgeführt und die Steigungen auf signifikante Unterschiede überprüft. Die resultierenden Fitparameter der individuellen Anpassungsgeraden sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Zur Überprüfung, inwiefern die Induktion der RIF abhängig von der Versuchsperson ist, wurden die Steigungen nach Versuchspersonen sortiert und es wurde durch den Shapiro-Wilk-Test bestätigt, dass eine Normalverteilung in jeder der vier Gruppen vorliegt. Vergleiche aller

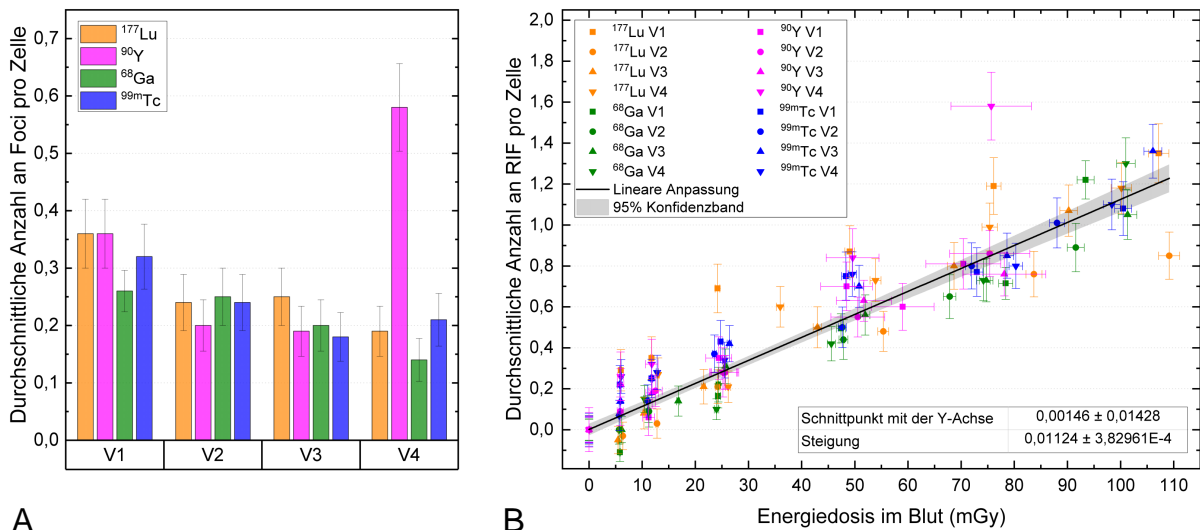


Abb. 3.3: Ergebnisse der *Ex-vivo*-Bestrahlungen mit β - und γ -Emitttern. **A:** Nullwerte der Versuchspersonen in den jeweils vier durchgeführten Versuchsreihen. Alle gezeigten Werte beziehen sich auf unbestrahlte Proben und das in der Legende angegebene Nuklid kennzeichnet ausschließlich die Zugehörigkeit zur entsprechenden Versuchsreihe. **B:** *Ex-vivo*-Kalibrierkurve für β - und γ -Emitter: Anzahl der RIF pro Zelle als Funktion der Energiedosis im Blut mit linearer Anpassungskurve und 95% Konfidenzband.

Tab. 3.4: Fitparameter der individuellen linearen Anpassungskurven für die 16 mit β - beziehungsweise γ -Emittern durchgeführten Versuchsreihen.

Nuklid	Versuchsperson	Schnittpunkt mit der y-Achse	Steigung (mGy^{-1})
^{177}Lu	V1	$0,1660 \pm 0,0753$	$0,0127 \pm 0,0018$
^{177}Lu	V2	$-0,0430 \pm 0,0405$	$0,0089 \pm 0,0009$
^{177}Lu	V3	$-0,0568 \pm 0,0418$	$0,0125 \pm 0,0012$
^{177}Lu	V4	$0,0229 \pm 0,0551$	$0,0123 \pm 0,0013$
^{90}Y	V1	$-0,0141 \pm 0,0644$	$0,0122 \pm 0,0019$
^{90}Y	V2	$0,0173 \pm 0,0434$	$0,0110 \pm 0,0016$
^{90}Y	V3	$0,0591 \pm 0,0433$	$0,0098 \pm 0,0016$
^{90}Y	V4	$0,0295 \pm 0,0799$	$0,0180 \pm 0,0028$
^{68}Ga	V1	$-0,0954 \pm 0,0511$	$0,0122 \pm 0,0014$
^{68}Ga	V2	$-0,0259 \pm 0,0429$	$0,0099 \pm 0,0012$
^{68}Ga	V3	$-0,0225 \pm 0,0400$	$0,0106 \pm 0,0010$
^{68}Ga	V4	$-0,0554 \pm 0,0647$	$0,0112 \pm 0,0018$
^{99m}Tc	V1	$0,1082 \pm 0,0510$	$0,0102 \pm 0,0012$
^{99m}Tc	V2	$0,0173 \pm 0,0437$	$0,0111 \pm 0,0012$
^{99m}Tc	V3	$0,0563 \pm 0,0402$	$0,0118 \pm 0,0010$
^{99m}Tc	V4	$0,0986 \pm 0,0530$	$0,0102 \pm 0,0013$

Gruppen untereinander durch sechs unabhängige t -Tests ergaben, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der vier Gruppen besteht. Analog dazu wurden die Steigungen nach den verwendeten Radionukliden sortiert, um zu überprüfen, ob eine Nuklidabhängigkeit der Induktion der RIF vorliegt. Da für eine der vier Gruppen, für die Versuchsreihen mit ^{177}Lu , keine Normalverteilung bestätigt werden konnte, wurde in diesem Fall der Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich angewendet. Dieser ergab, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht. Die Induktion der RIF ist damit weder abhängig von der Versuchsperson noch von dem Radionuklid, das für die Bestrahlung verwendet wurde.

Zur Erstellung einer allgemeinen *Ex-vivo*-Kalibrierkurve für β - und γ -Emitter, welche die Dosisabhängigkeit der RIF beschreibt, wurden daher alle Datenpunkte zusammengefasst und eine lineare Anpassung durchgeführt. Die resultierende Anpassungsgerade mit einem 95% Konfidenzband ist in Abbildung 3.3B gezeigt. Der Korrelationskoeffizient lag bei $r = 0,94$. Die Geradengleichung der Kalibrierkurve ist gegeben durch:

$$\emptyset \text{ Anzahl an RIF pro Zelle} = (0,0112 \pm 0,0004) \text{ mGy}^{-1} \cdot D_{\text{Blut}} + (0,0015 \pm 0,0143) \quad (3.2)$$

3.3.3 *Ex-vivo*-Kalibrierkurve für α -Emitter

Für die α -Emitter ^{223}Ra und ^{224}Ra wurden die in Tabelle 3.5 aufgeführten S-Werte und Dosiskoeffizienten berechnet. Die Dosiskoeffizienten $d_{\text{Blut}}(1 \text{ h})$ für α -Teilchen und für Elektronen wurden verwendet, um den Beitrag der α -Teilchen zur Energiedosis im Blut (α -Dosis $D_{\text{Blut},\alpha}$) und den

Tab. 3.5: *S*-Werte und Dosiskoeffizienten für die α -Emitter ^{223}Ra und ^{224}Ra .

Nuklid	$S_{\text{Blut} \leftarrow \text{Blut}}$ ($\text{Gy s}^{-1} \text{Bq}^{-1} \text{ml}$)			$d_{\text{Blut}}(1 \text{ h})$ (mGy ml kBq^{-1})		
	α -Teilchen	Elektronen	Gesamt	α -Teilchen	Elektronen	Gesamt
^{223}Ra	$4,30 \cdot 10^{-9}$	$1,67 \cdot 10^{-10}$	$4,46 \cdot 10^{-9}$	15,45	0,60	16,05
^{224}Ra	$4,34 \cdot 10^{-9}$	$1,45 \cdot 10^{-10}$	$4,48 \cdot 10^{-9}$	15,56	0,52	16,08

Beitrag der Elektronen zur Energiedosis im Blut (β -Dosis $D_{\text{Blut},\beta}$) gemäß Gleichung 2.21 separat zu berechnen.

Im Zuge der Aktivitätsbestimmung wurde überprüft, ob ein Gleichgewicht zwischen dem Mutternuklid und den Tochternukliden vorherrscht. Dadurch wurde festgestellt, dass während der Durchführung der ersten Versuchsreihe mit ^{224}Ra (V4) kein Gleichgewicht bestand und die Aktivitätskonzentration in den Blutproben daher nicht zuverlässig bestimmt werden konnte. Diese Messreihe wurde daher von weiteren Analysen ausgeschlossen und bei der Erstellung der Kalibrierkurve nicht berücksichtigt. Für alle anderen Messreihen konnte das Gleichgewicht durch die Auswertung des Gammaskpektrums bestätigt werden.

In den jeweils 100 ausgewerteten Zellen der unbestrahlten Proben ließ sich nur bei einer Versuchsperson (V8) eine einzelne α -Spur nachweisen. Die unbestrahlten Proben der anderen Versuchspersonen enthielten keine α -Spuren. Hingegen ließen sich in allen bestrahlten Proben α -Spuren nachweisen. Bei der höchsten untersuchten Dosis von 136 mGy wurde das Maximum von 30 α -Spuren in 100 Zellen erreicht. Die Anzahl der α -Spuren in Abhängigkeit der α -Dosis ist in Abbildung 3.4A gezeigt. Analog zum Vorgehen bei den Versuchsreihen, die mit β - und γ -emittierenden Nukliden durchgeführt wurden, wurden individuelle lineare Anpassungen für jede der Versuchsreihen durchgeführt. Die resultierenden Fitparameter der individuellen Anpassungsgeraden sind in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Eine Überprüfung, inwiefern die Induktion der α -Spuren abhängig von der Versuchsperson oder dem

Tab. 3.6: *Fitparameter der individuellen linearen Anpassungskurven für die acht mit α -Emittieren durchgeführten Versuchsreihen.*

Nuklid	Versuchsperson	Schnittpunkt mit der y-Achse	Steigung (mGy^{-1})
^{223}Ra	V1	$0,651 \pm 0,863$	$0,191 \pm 0,042$
^{223}Ra	V4	$-0,398 \pm 0,781$	$0,205 \pm 0,024$
^{223}Ra	V5	$-0,061 \pm 0,868$	$0,240 \pm 0,037$
^{223}Ra	V6	$0,327 \pm 0,975$	$0,239 \pm 0,028$
^{223}Ra	V7	$0,057 \pm 0,868$	$0,203 \pm 0,034$
^{223}Ra	V8	$1,263 \pm 0,924$	$0,242 \pm 0,036$
^{224}Ra	V1	$0,479 \pm 0,924$	$0,205 \pm 0,033$
^{224}Ra	V5	$0,424 \pm 0,935$	$0,235 \pm 0,035$

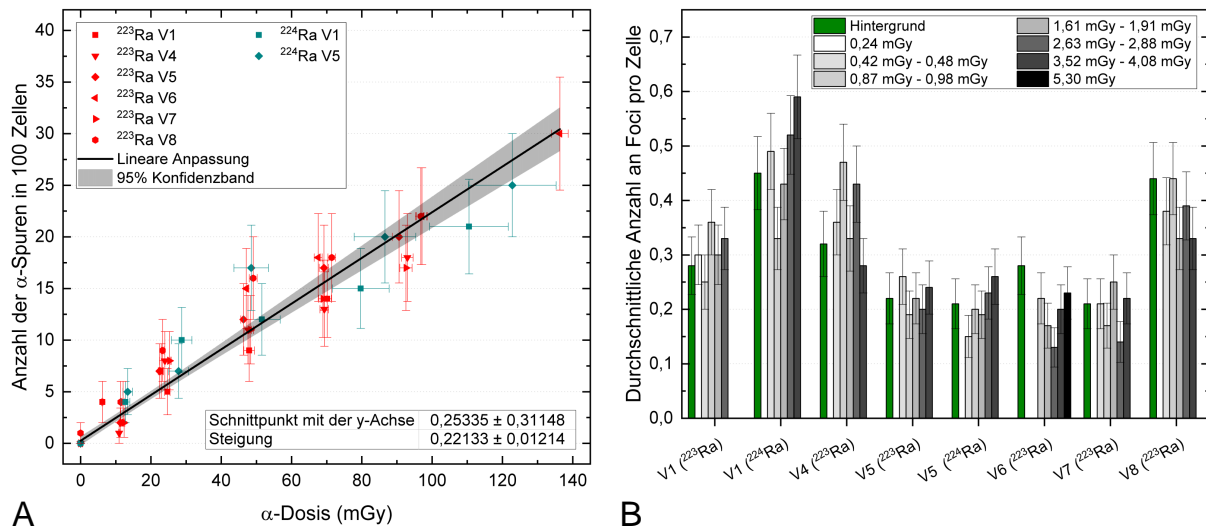


Abb. 3.4: Ergebnisse der *Ex-vivo*-Bestrahlungen mit α -Emittlern. **A:** *Ex-vivo*-Kalibrierkurve für α -Emitter: Anzahl der α -Spuren in 100 Zellen als Funktion der α -Dosis (= Beitrag der α -Teilchen zur Energiedosis im Blut) mit linearer Anpassungskurve und 95% Konfidenzband. **B:** Durchschnittliche Anzahl an Foci pro Zelle in den unbestrahlten Proben (grüne Balken) und den bestrahlten Proben (graue Balken) der jeweiligen Versuchsperson. Die durchschnittliche Anzahl an Foci pro Zelle in den bestrahlten Proben korreliert nicht mit der berechneten β -Dosis (= Beitrag der Elektronen zur Energiedosis im Blut), die in der Legende angegeben ist, sondern gleicht in den meisten Fällen dem entsprechenden Hintergrundwert.

verwendeten Nuklid ist, war aufgrund der geringen Anzahl an Versuchsreihen pro Versuchsperson und der unterschiedlichen Anzahl an Versuchsreihen pro Nuklid nicht analog zum Vorgehen bei den mit β - und γ -Emittlern bestrahlten Proben möglich. Eine lineare Anpassung der zusammengefassten Daten aller mit ^{223}Ra durchgeführten Testreihen ergab folgende Geradengleichung mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,97$:

$$\text{Anzahl an } \alpha\text{-Spuren in 100 Zellen} = (0,222 \pm 0,014) \text{ mGy}^{-1} \cdot D_{\text{Blut},\alpha} + (0,199 \pm 0,354) \quad (3.3)$$

Eine lineare Anpassung der zusammengefassten Daten aller mit ^{224}Ra durchgeführten Testreihen ergab folgende Geradengleichung mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,96$:

$$\text{Anzahl an } \alpha\text{-Spuren in 100 Zellen} = (0,220 \pm 0,014) \text{ mGy}^{-1} \cdot D_{\text{Blut},\alpha} + (0,447 \pm 0,657) \quad (3.4)$$

Da die Steigungen beider Geraden identisch sind, ist davon auszugehen, dass die Anzahl der α -Spuren nicht vom verwendeten Isotop abhängig ist, sondern, in Übereinstimmung mit den Beobachtungen nach Bestrahlungen mit β - und γ -emittierenden Nukliden, eine nuklidunabhängige Induktion von DNA-Schäden vorliegt, die mit der Energiedosis im Blut korreliert. Zur Erstellung einer allgemeinen *Ex-vivo*-Kalibrierkurve für α -Emitter, welche die Dosisabhängigkeit der α -Spuren beschreibt, wurden daher alle Datenpunkte zusammengefasst und eine lineare Anpassung durchgeführt. Die resultierende Anpassungsgerade mit einem 95% Konfidenzband ist in Abbildung 3.4A gezeigt. Der Korrelationskoeffizient lag bei $r = 0,97$. Die Geradengleichung der Kalibrierkurve ist gegeben durch:

$$\text{Anzahl an } \alpha\text{-Spuren in 100 Zellen} = (0,221 \pm 0,012) \text{ mGy}^{-1} \cdot D_{\text{Blut},\alpha} + (0,253 \pm 0,311) \quad (3.5)$$

Zusätzlich zu den α -Spuren wurden auch die kleinen, runden Foci (mit Durchmessern $\leq 1,1 \mu\text{m}$) in den Zellkernen gezählt und überprüft, ob ihre Anzahl, analog zu dem nach Bestrahlung mit reinen β - oder γ -emittierenden Nukliden beobachteten Verhalten, mit der β -Dosis korreliert. Eine Korrelation zwischen der Anzahl an kleinen Foci und der berechneten β -Dosis konnte nicht gefunden werden; möglicherweise aufgrund der niedrigen Dosiswerte im Bereich von 0,24 mGy bis maximal 5,30 mGy. Im Rahmen der Messgenauigkeit entsprach die durchschnittliche Anzahl an kleinen Foci pro Zelle in der Regel dem Hintergrundwert der unbestrahlten Probe (Abbildung 3.4B).

3.4 Zusammenfassung und Diskussion

Durch interne *Ex-vivo*-Bestrahlung von Blutproben mit unterschiedlichen Radionukliden konnte im Rahmen dieser Studie der Zusammenhang zwischen der Energiedosis im Blut und der Induktion der mittels des γ -H2AX+53BP1-Assays quantifizierten strahlungsinduzierten DNA-Doppelstrangbrüche in PBMCs von Versuchspersonen untersucht werden. Unabhängig vom verwendeten Nuklid konnte generell gezeigt werden, dass die Induktion von DNA-Schäden abhängig von der Energiedosis im Blut ist und in dem hier untersuchten, während nuklearmedizinischer Therapien relevanten Dosisbereich von 5 mGy bis 136 mGy linear mit dieser ansteigt. Während die Anzahl der strahlungsinduzierten γ -H2AX+53BP1-Foci (RIF) als Biodosimeter nach Expositionen mit β - beziehungsweise γ -Emittern verwendet werden kann, ist die Anzahl der γ -H2AX und 53BP1 enthaltenden Spuren (α -Spuren) ein geeigneter Parameter für die Biodosimetrie nach Expositionen mit α -emittierenden Nukliden.

Um die *In-vivo*-Bestrahlung im Patienten während nuklearmedizinischer Therapien oder Diagnostik möglichst passend *ex vivo* zu simulieren und gleichzeitig die Vergleichbarkeit zu früheren Studien [9] zu gewähren, wurde für die hier durchgeführten Versuche eine homogene Bestrahlung durch Inkubation auf einem Rollenmischer mit einer Bestrahlungsdauer von 1 h gewählt. Kürzere Bestrahlungsdauern wären weiter entfernt von der kontinuierlichen internen Bestrahlung im Patienten und hätten zur Folge, dass höhere Aktivitätsmengen eingesetzt werden müssten, um die gewünschten Energiedosiswerte im Blut zu erreichen [15]. Bei längeren Bestrahlungsdauern, die eine Bestrahlung *in vivo* möglicherweise besser nachbilden würden, wäre die Verarbeitung einer geringeren Anzahl an Proben pro Versuchsreihe möglich gewesen, was zu einer Verringerung der Genauigkeit der Kalibrierkurven geführt hätte. Des Weiteren würde die während der Bestrahlung einsetzende Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche das Ergebnis möglicherweise beeinflussen [15, 48, 49].

Im Rahmen der Studie wurden in der Nuklearmedizin verwendete Nuklide mit unterschiedlichen Emissionseigenschaften eingesetzt. Ein Vergleich der Schadensinduktion der unterschiedlichen β - und γ -emittierenden Radionuklide zeigte, dass die durchschnittliche Anzahl der RIF nicht von dem zur Bestrahlung verwendeten Nuklid abhängt. Auch nuklidabhängige Unterschiede in der Größe und Geometrie der Foci konnten nach Bestrahlung mit β - und γ -Emittern nicht festgestellt werden. Hingegen kann durch Analyse der Größe und Geometrie der γ -H2AX+53BP1-Foci und Spuren eindeutig unterschieden werden, ob die Zellen mit β - beziehungsweise γ -Emittern oder mit α -Emittern bestrahlt wurden.

Für die β^- -Emitter ^{131}I und ^{177}Lu wurde von Eberlein *et al.* bereits 2015 eine Kalibrierkurve unter Verwendung der gleichen Methodik erstellt [9]. Der Wert der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Geradensteigung liegt mit $(0,0112 \pm 0,0004) \text{ mGy}^{-1}$ leicht unterhalb des von Eberlein *et al.* veröffentlichten Wertes von $(0,0147 \pm 0,0006) \text{ mGy}^{-1}$ [9]. Mögliche Gründe für diese Abweichung könnten in dem erweiterten Versuchspersonen- und Nuklidkollektiv in dieser Studie sowie der erhöhten Anzahl an Proben insgesamt liegen. Zur Erstellung der Kalibrierkurve wurden außerdem zusätzlich die Unsicherheiten der Energiedosis im Blut berücksichtigt. Zudem lassen sich auch kleinere methodische Schwankungen nicht vollständig ausschließen. Verglichen mit dem Wert der Steigung einer *In-vivo*-Kalibrierkurve von $(0,0117 \pm 0,0006) \text{ mGy}^{-1}$, die aus Daten erstellt wurde, welche während der ersten Stunden nach Radioiodtherapien erhoben wurden [11], zeigt der ermittelte Wert eine sehr gute Übereinstimmung.

Neben den wenigen Studien, in denen γ -H2AX- und/oder 53BP1-Biomarker zur Quantifizierung von DNA-Schäden nach interner Exposition eingesetzt wurden, gibt es eine Vielzahl an Untersuchungen der dosisabhängigen Induktion von Doppelstrangbrüchen nach externer Bestrahlung. Kalibrierkurven konnten nach externer *Ex-vivo*-Bestrahlung von Blutproben durch Röntgenstrahlung oder γ -Strahlung für einen ähnlichen Dosisbereich wie in dieser Studie erstellt werden [40, 57–59]. Die Proben wurden dazu 15 min bis 45 min nach der Bestrahlung, die mit einer vergleichsweise sehr viel höheren Dosisleistung von $0,01 \text{ Gy min}^{-1}$ bis $0,5 \text{ Gy min}^{-1}$ erfolgte, ausgewertet und γ -H2AX-Foci in Lymphozyten quantifiziert [40, 57–59]. Trotz der Unterschiede in der Methodik, die sowohl die Bestrahlung und Dosisbestimmung als auch die Aufbereitung und Auswertung der Blutproben betreffen, zeigt der Vergleich mit den hier aufgeführten Kalibrierkurven nach externer Bestrahlung eine weitgehende Übereinstimmung: Im Bereich zwischen 20 mGy und 1 Gy ermittelten Roch-Lefèvre *et al.* eine Kalibrierkurve mit einer Steigung von $(0,0107 \pm 0,0005) \text{ mGy}^{-1}$ nach Bestrahlung mit ^{60}Co - γ -Strahlung mit einer Dosisleistung von $0,5 \text{ Gy min}^{-1}$ [58]. In einer von Golfier *et al.* durchgeführten Studie lag der entsprechende Wert bei $(0,0074 \pm 0,0001) \text{ mGy}^{-1}$ nach der Bestrahlung von Blutproben in einem CT-Scanner mit einer Dosisleistung von $0,3 \text{ Gy min}^{-1}$ [59]. Redon *et al.* ermittelten eine Steigung von $(0,0115 \pm 0,0008) \text{ mGy}^{-1}$ für den Dosisbereich zwischen 20 mGy und 2 Gy nach externer γ -Bestrahlung der Blutproben. Sie zeigten jedoch, dass im Bereich niedriger Dosen, von 20 mGy bis 100 mGy, eine verhältnismäßig höhere Anzahl an Foci induziert wird, resultierend in einer Steigung der Kalibrierkurve von $0,0147 \text{ mGy}^{-1}$ [57]. Auch Beels *et al.* beobachteten eine erhöhte Foci-Induktion im Niedrigdosisbereich bis 10 mGy (Steigung von $0,10 \text{ mGy}^{-1}$) im Vergleich zum Dosisbereich von 10 mGy bis 500 mGy (Steigung von $0,011 \text{ mGy}^{-1}$), jedoch ausschließlich nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung mit $0,02 \text{ Gy min}^{-1}$ bis $0,04 \text{ Gy min}^{-1}$ und nicht in durch eine ^{60}Co -Quelle bestrahlten Proben. Nach γ -Bestrahlung mit Dosisleistungen von $0,01 \text{ Gy min}^{-1}$ bis $0,3 \text{ Gy min}^{-1}$ ergab sich eine Kalibrierkurve mit einer Steigung von $0,0086 \text{ mGy}^{-1}$ [40]. Ein zweiphasiges Verhalten, wie von Redon *et al.* und Beels *et al.* beschrieben, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet. Da für die Erstellung der *Ex-vivo*-Kalibrierkurve für β - und γ -emittierende Nuklide jedoch ausschließlich der Dosisbereich von 5,47 mGy bis 109,15 mGy untersucht wurde, kann daraus nicht geschlossen werden, ob sich die Induktion der Foci bei deutlich niedrigeren beziehungsweise höheren Energiedosen ändert.

Im Bereich der Nuklearmedizin gibt es neben der bereits diskutierten Untersuchung von Eberlein *et al.* [9] nur eine weitere 2019 veröffentlichte Studie, die DNA-Schäden nach der Bestrahlung von Blutproben *ex vivo* durch Inkubation mit unterschiedlichen Radionukliden beschreibt: Schmeiser

et al. verwendeten den α -Emitter ^{225}Ac , die β^- -Emiter ^{177}Lu und ^{90}Y sowie die β^+ -Emiter ^{18}F und ^{68}Ga , jeweils in mehreren unterschiedlichen Aktivitätskonzentrationen, um DNA-Schäden mit Hilfe von Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay) zu quantifizieren [60]. Die Inkubationsdauer betrug fünf Tage (zur Bestrahlung mit ^{225}Ac , ^{177}Lu und ^{90}Y) beziehungsweise 24 h (zur Bestrahlung mit ^{18}F und ^{68}Ga). Für alle Nuklide war ein Anstieg der DNA-Schäden mit steigender Aktivitätskonzentration im Blut zu beobachten. Ein direkter Vergleich zwischen den Nukliden und auch mit den Daten aus dieser Arbeit ist aufgrund der fehlenden Dosimetrie nicht möglich. Aus dem Vergleich der durch Zugabe von 2 kBq ml^{-1} induzierten DNA-Schäden berechneten die Autoren jedoch, dass der durch den α -Emitter ^{225}Ac induzierte Schaden 200-fach höher ist als der durch den β^- -Emitter ^{177}Lu induzierte Schaden [60].

Um DNA-Schäden nach interner Bestrahlung mit α -Emittern zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die Radiumisotope ^{223}Ra und ^{224}Ra verwendet. Die Trajektorien der emittierten α -Teilchen waren als γ -H2AX+53BP1 enthaltende α -Spuren in den Zellkernen zu erkennen. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Ding *et al.* war die Verteilung der beiden Biomarker innerhalb der Spuren dabei oft unterschiedlich und in der Regel weniger 53BP1 vorhanden [61]. In seltenen Fällen war in einzelnen, meist breiter verteilten Spuren kein 53BP1 enthalten. Dies könnte mit unterschiedlichen Chromatindichten zusammenhängen oder damit, dass Entscheidungen über den Signalweg der DNA-Reparatur bereits getroffen wurden und daher kein 53BP1 mehr vorhanden war [62]. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Zellen kein 53BP1 exprimierten. Unterschiede in der Morphologie der α -Spuren könnten mit einer zeitlichen Veränderung der den Doppelstrangbruch enthaltenden Chromatindomänen zusammenhängen [55].

Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der α -Spuren linear mit der Energiedosis im Blut zunimmt. Das Ergebnis, dass die Anzahl der α -Spuren einen geeigneten Parameter für biologische Dosisabschätzungen darstellt, ist in guter Übereinstimmung mit den Resultaten von Studien, die α -Spuren nach Bestrahlung mit gasförmigem ^{222}Rn untersuchten [61, 63]. Nach der *Ex-vivo*-Bestrahlung von Lymphozyten von Versuchspersonen mit Radongas quantifizierten Ding *et al.* 0,10 γ -H2AX enthaltende α -Spuren in 100 Zellen pro Milligray und damit nur etwa halb so viele wie in dieser Arbeit [61]. Der untersuchte Dosisbereich war jedoch mit 1,74 mGy bis 6,85 mGy niedriger als der hier untersuchte Dosisbereich von 6 mGy bis 136 mGy, was einen direkten Vergleich verhindert. Auch die Unterschiede in der Bestrahlung und der Dosisbestimmung erschweren die Vergleichbarkeit [61].

Da durch konventionelle Lichtmikroskopie nicht aufgelöst werden konnte, wie viele Foci in einer α -Spur enthalten sind, ist es durch diese Auswertung nicht möglich, einen Faktor für die biologische Wirksamkeit von α -Emittern im Vergleich zu β^- - beziehungsweise γ -Emittern zu bestimmen. Eine genauere Analyse der α -Spuren kann nur mithilfe hochauflösender Mikroskopieverfahren erfolgen. Scherthan *et al.* untersuchten die Nanostruktur der DNA-Schäden in einer der im Rahmen dieser Arbeit mit ^{223}Ra bestrahlten Probe mittels Single Molecule Localization Microscopy (SMLM) [64]. Die minimale Anzahl der pro α -Spur enthaltenen Doppelstrangbrüche konnte damit auf 12 ± 9 abgeschätzt werden, da durchschnittlich diese Anzahl an MRE11-Nano-Clustern in einer typischen α -Spur detektiert werden konnten [64].

Neben den α -Spuren waren auch in den mit den Radiumisotopen bestrahlten Zellen kleine, einzeln verteilte Foci, wie nach Bestrahlung mit β^- - oder γ -Emittern, detektierbar. Eine Korrelation mit der berechneten β^- -Dosis konnte jedoch nicht gefunden werden. Im Rahmen der Messgenauigkeit

entsprech die durchschnittliche Anzahl der kleinen Foci pro Zelle vielmehr dem individuellen Nullwert der Versuchsperson, was möglicherweise mit den sehr niedrigen β -Dosen von < 6 mGy oder auch erhöhten statistischen Unsicherheiten in diesem Niedrigdosisbereich zusammenhängen könnte. Da dieser Dosisbereich in den mit β - und γ -Emitttern durchgeführten *Ex-vivo*-Versuchsreihen nicht untersucht wurde, ist ein Vergleich der Ergebnisse nicht möglich. Des Weiteren ist bisher nicht bekannt, ob sich die Induktion von Doppelstrangbrüchen bei interner Bestrahlung mit Nuklidgemischen, das heißt beispielsweise bei gleichzeitiger Bestrahlung mit α -, β - und γ -emittierenden Radionukliden, die in den Zerfallsketten der Radiumisotope vorkommen, ändert. Sollazzo *et al.* konnten zeigen, dass Zellen nach gemischter externer Bestrahlung mit hohem und niedrigem LET (α -Teilchen und Röntgenstrahlung) die DNA-Schäden auf eine Weise verarbeiten, die durch die Annahme einer einfachen additiven Wirkung beider Strahlungsarten nicht vorhergesagt werden kann [65]. Auch Ding *et al.* analysierten neben den durch Radongas induzierten α -Spuren die Induktion von einzelnen γ -H2AX-Foci und fanden, im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie, auch bei der niedrigsten Dosis von 1,74 mGy eine signifikant erhöhte Anzahl an γ -H2AX-Foci gegenüber dem Nullwert [61]. Sie unterschieden jedoch nicht zwischen Foci mit kleinem Durchmesser und größerem Durchmesser (zum Beispiel $> 1,1 \mu\text{m}$), welche hier als Spuren von α -Teilchen gewertet wurden, die senkrecht zur Bildebene verliefen. Des Weiteren berechneten Ding *et al.* die angegebenen Energiedosen aus Messungen mit einem CR-39 Kernspurdetektor und berücksichtigten somit keinen separaten β -Beitrag zur Energiedosis [61]. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass insbesondere der Bereich sehr niedriger Dosen < 6 mGy, in dem die Unsicherheiten in der Dosisbestimmung und der Quantifizierung der DNA-Schäden in der Regel erhöht sind, einige Kontroversen aufwirft und weiterer Forschungsbedarf besteht. Zudem könnten die bisher noch fehlenden Untersuchungen nach gemischten Bestrahlungen von besonderem Interesse sein, da Radionuklidgemische auch für nuklearmedizinische Therapien in Zukunft vermehrt eingesetzt werden könnten [66].

4 Zeit- und Dosisabhängigkeit von DNA-Schäden während Therapie mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA

4.1 Einleitung

PSMA ist in Prostatakarzinomzellen stark überexprimiert, was es zu einem besonders geeigneten Zielantigen für therapeutische Wirkstoffe sowie die diagnostische Bildgebung macht [2, 3]. In den letzten Jahren wurden PSMA-bindende Liganden in einer zunehmenden Anzahl an medizinischen Zentren weltweit für die Behandlung des metastasierten, kastrationsresistenten Prostatakarzinoms eingesetzt. Verschiedene Studien haben vielversprechende Ergebnisse gezeigt, darunter hohe Ansprechraten, ein günstiges Sicherheitsprofil und Schmerzreduktion [67–72].

Trotz der steigenden Anzahl an Therapien mit ¹⁷⁷Lu markierten PSMA-Liganden wurden DNA-Schäden im Blut der Patienten während dieser Therapie bisher noch nicht untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Zeit- und Dosisabhängigkeit der Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in PBMCs von Prostatakarzinom-Patienten während ihres ersten Therapiezyklus mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA untersucht werden. Die Ergebnisse wurden 2019 im „European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging“ (EJNMMI) veröffentlicht [73].

4.2 Methoden

4.2.1 Patienten

16 Prostatakarzinom-Patienten, die ihre erste Therapie mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA erhielten, wurden in die Studie eingeschlossen. Die Verabreichung einer Standardaktivität von 6 GBq des mit ¹⁷⁷Lu (EndolucinBeta®, ITM Isotopen Technologien München AG) markierten PSMA-Liganden (PSMA I&T, SCINTOMICS GmbH) erfolgte intravenös mit Hilfe eines Perfusors über einen Zeitraum von 20 min. Das Ende der Injektion wurde als Start- und Referenzzeitpunkt für diese Studie gewählt. Nach der Verabreichung wurden die Patienten für zwei Tage stationär aufgenommen. Vor und nach der Therapie wurden bei allen Patienten diagnostische PET/CT-Untersuchungen mit ⁶⁸Ga gelabelten PSMA-Liganden zur Überprüfung des Uptakes und zum Staging beziehungsweise Restaging sowie eine Nierenzintigraphie mit [^{99m}Tc]Tc-Mercaptoacetyltriglycin (MAG3) durchgeführt. Des Weiteren wurde die Konzentration des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Serum vor und nach der Therapie bestimmt. Die Evaluation des Therapieerfolgs basierte auf den Ergebnissen der Bildgebung, gemäß der „Modified Positron Emission Tomography Response Criteria in Solid Tumors“ mPERCIST und „Response Evaluation Criteria in Solid Tumors“ RECIST1.1 [74, 75],

und auf der Änderung der PSA-Konzentration im Serum, gemäß der „Prostate Cancer Group 3“ (PCWG3) Kriterien [76].

4.2.2 Blutentnahmen und Dosisleistungsmessungen

Blutproben wurden vor Verabreichung des Radiopharmakons (Zeitpunkt t_0 , zur Bestimmung des individuellen Nullwerts) und nominell 1 h (t_1), 2 h (t_2), 3 h (t_3), 4 h (t_4), 24 h (t_5), 48 h (t_6) und 96 h (t_7) nach Verabreichung entnommen. Für die Blutentnahmen wurden Li-Heparin Blutentnahmeröhrchen (S-Monovette®, Sarstedt) verwendet. Direkt nach der Entnahme wurden die Blutproben wie in 2.5.3 beschrieben für die Auswertung mittels des γ -H2AX+53BP1-Assays aufbereitet. Ein Teil jeder Blutprobe wurde zur Bestimmung der Aktivitätskonzentration im Blut im Germanium-Detektor gemessen, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben.

Zur Bestimmung des Aktivitätsverlaufs im Ganzkörper wurden, wie in Kapitel 2.3.3 erläutert, wiederholt Messungen der Dosisleistung und Ganzkörperaufnahmen mit der Gammakamera durchgeführt. Am Tag des Therapiebeginns wurde die Dosisleistung direkt nach Verabreichung (vor der ersten Miktion und Defäkation) und etwa 2 h, 4 h und 7 h danach gemessen, gefolgt von täglichen Routinemessungen alle 12 h bis zur Entlassung des Patienten aus der Therapiestation. Gammakameramessungen erfolgten nominell 4 h, 24 h, 48 h und 96 h nach Verabreichung. Eine Beschreibung der Auswertung und Normierung der Messungen findet sich in Kapitel 2.3.3. 24 h oder 48 h nach Verabreichung wurde zudem eine SPECT/CT-Aufnahme (Symbia T2 oder Symbia Intevo Bold, Siemens Healthineers) gemacht, die für diese Studie jedoch nicht weiter ausgewertet wurde. Um eine Beeinflussung der Anzahl der γ -H2AX+53BP1-Foci durch die zusätzliche Strahlenexposition durch die CT zu vermeiden, wurde die entsprechende Blutprobe immer vor der SPECT/CT-Untersuchung entnommen.

4.2.3 Berechnung der Energiedosis im Blut

Die Berechnung der Energiedosis im Blut erfolgte wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben. Gleichung 2.17 wurde mit den S-Werten für ^{177}Lu (aus [10, 35]) und, zur besseren Übersicht, mit $t_D = t$ verwendet:

$$D_{\text{Blut}}(t) = A_0 \cdot \left(85,3 \frac{\text{Gy ml}}{\text{GBq h}} \cdot (\tau_{\text{Blut}}(t) + \tau_{\text{Blut},i}) + \frac{0,00185 \text{ Gy kg}^{2/3}}{wt^{2/3}} \frac{1}{\text{GBq h}} \cdot (\tau_{\text{GK}}(t) + \tau_{\text{GK},i}) \right) \quad (4.1)$$

Die TIACs τ_{Blut} und τ_{GK} wurden patientenspezifisch aus den Zeit-Aktivitäts-Kurven des Blutes und des Ganzkörpers (siehe Kapitel 2.4.2) nach Gleichungen 2.19 und 2.20 berechnet. Zusätzlich wurde mit $\tau_{\text{Blut},i}$ und $\tau_{\text{GK},i}$ die 20-minütige Injektionsphase berücksichtigt. Dazu wurde ein linearer Uptake für $-20 \text{ min} < t < 0$ bis zu den Werten $\tau_{\text{Blut}}(t = 0)$ beziehungsweise $\tau_{\text{GK}}(t = 0)$ angenommen.

Die entsprechende Dosisleistung im Blut $\dot{D}_{\text{Blut}}(t)$ ist definiert als die zeitliche Ableitung der Energiedosis im Blut.

Von einer Abschätzung der Unsicherheiten der Energiedosis im Blut beziehungsweise der entsprechenden Dosisleistung, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, wurde in dieser Studie abgesehen. Die Unsicherheiten der Energiedosis im Blut beziehungsweise der entsprechenden Dosisleistung wurden bei den durchgeführten Analysen, beispielsweise den linearen Anpassungen, demnach nicht berücksichtigt und die entsprechenden Fehlerbalken sind nicht aufgeführt.

4.2.4 γ -H2AX+53BP1-Assay

Die Quantifizierung der kolokalisierenden γ -H2AX+53BP1-Foci und Berechnung der RIF erfolgte wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Patienten

Insgesamt wurden 16 Patienten (LuP1-LuP16) in einem durchschnittlichen Alter von (70 ± 9) Jahren in die Studie eingeschlossen. Die verabreichte Aktivität lag im Mittel bei $(5,9 \pm 0,2)$ GBq [^{177}Lu]Lu-PSMA I&T. Die individuellen Daten der Patienten sind in Tabelle 4.1 gelistet.

Die diagnostische PET/CT-Untersuchung wurde in einem Zeitraum von 7 bis 106 Tagen vor der Therapie und zwischen 39 und 114 Tagen nach der Therapie durchgeführt. Die Nierenszintigraphie erfolgte 3 bis 31 Tage vor der Therapie, außer bei den Patienten LuP2 und LuP4, bei denen der Scan (mit < 100 MBq [^{99m}Tc]Tc-MAG3) am Tag des Therapiebeginns, mindestens 3 h vor Verabreichung der Therapieaktivität, durchgeführt wurde.

Aufgrund des individuellen Patientenmanagements konnten die nominellen Zeitpunkte für die Blutentnahmen und Messungen nicht immer genau eingehalten werden oder mussten in einzelnen Fällen entfallen. Zum letzten Zeitpunkt, 96 h nach Verabreichung, war bei den Patienten LuP5, LuP8 und LuP12 keine Blutentnahme und keine Gammakamera-Aufnahme möglich. Bei LuP5

Tab. 4.1: Demographische und klinische Daten der 16 Patienten LuP1 bis LuP16.

Patienten ID	Alter (a)	Gewicht (kg)	Verabreichte Aktivität (MBq)	Gleason-Score	PSA (ng ml^{-1})	
					vor Therapie	nach Therapie
LuP1	69	78	6020	3+4	48	25
LuP2	64	80	6015	4+4	0,1	0,07
LuP3	68	100	5907	4+3	6	6
LuP4	77	77	5785	3+5	58	24
LuP5	69	83	6215	3+4	89	18
LuP6	70	79	5989	5+4	181	683
LuP7	66	85	5758	4+5	151	243
LuP8	68	83	5893	4+5	42	–
LuP9	74	77	6020	4+5	1020	529
LuP10	81	71	5703	4+4	252	199
LuP11	56	94	5860	4+4	158	140
LuP12	65	140	5960	4+4	147	144
LuP13	71	69	5476	3+4	3130	914
LuP14	54	86	5882	4+4	134	138
LuP15	80	104	5640	4+4	260	174
LuP16	71	85	6318	4+5	2810	13200

wurde der Scan stattdessen etwa 68 h nach Verabreichung durchgeführt. Bei Patient LuP11 war die zum Zeitpunkt t_3 (3 h nach Verabreichung) entnommene Blutprobe nicht auswertbar.

Alle Patienten hatten mehrere Vorbehandlungen. Zu diesen Vorbehandlungen gehörten operative Eingriffe (radikale Prostatektomie, Prostatovesiculektomie, Lymphadenektomie, Orchiektomie), externe Strahlentherapie, Therapie mit [^{223}Ra]RaCl₂, Therapie mit LHRH-Agonisten und -Antagonisten (Leuprorelin, Degarelix), Antiandrogentherapie (Abirateron, Bicalutamid, Enzalutamid, Flutamid), Chemotherapie (Docetaxel, Cabazitaxel) und Therapie mit Denosumab. Von den 16 Patienten zeigten 15 (alle außer LuP2) Knochenmetastasen und zwölf (alle außer LuP3, LuP7, LuP10 und LuP14) Lymphknotenmetastasen. Drei der Patienten (LuP8, LuP9 und LuP16) zeigten zusätzlich Lebermetastasen. Des Weiteren wies LuP9 auch Metastasen in der Pleura, der Nebenniere und den Muskeln auf.

Nach dem ersten Therapiezyklus wurde bei vier Patienten (LuP2, LuP4, LuP5 und LuP13) ein partielles Ansprechen festgestellt. Ein gemischtes Ansprechen zeigten zwei Patienten (LuP10 und LuP14). Bei drei Patienten (LuP1, LuP12 und LuP15) wurde die Krankheit als stabil eingeschätzt, während fünf der Patienten (LuP3, LuP6, LuP7, LuP9 und LuP11) einen progredienten Verlauf zeigten. Zwei Patienten (LuP8 und LuP16) verstarben nach dem ersten Therapiezyklus.

4.3.2 Dosimetrie

Die Energiedosen im Blut zu den unterschiedlichen Zeitpunkten t wurden mit Gleichung 4.1 berechnet. Zur Berechnung der patientenspezifischen TIACs $\tau_{\text{Blut}}(t)$ und $\tau_{\text{GK}}(t)$ wurden die entsprechenden Zeit-Aktivitäts-Kurven bis zum Zeitpunkt t integriert. Zur Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Aktivitätskonzentration im Blut wurden triexponentielle Fitfunktionen gewählt, während zur Beschreibung der Ganzkörper-Retention biexponentielle Fitfunktionen ausreichten und kleinere Fehler der Fitparameter aufzeigten.

Die Energiedosis im Blut direkt nach der Verabreichung, nach der 20-minütigen Injektionsphase, betrug im Mittel $(3,2 \pm 0,6)$ mGy. Die mittlere Gesamtdosis, die durch Integration bis $t = \infty$ berechnet wurde, lag bei (109 ± 28) mGy. Der niedrigste Wert für die Gesamtdosis betrug 76 mGy (LuP3 und LuP11), der höchste Wert lag bei 164 mGy (LuP9). Zu den Zeitpunkten t_1 , t_2 , t_3 und t_4 betrug die Energiedosis im Blut im Durchschnitt (17 ± 6) mGy, (27 ± 7) mGy, (34 ± 8) mGy und (40 ± 9) mGy. Zu späteren Zeitpunkten wurden Unterschiede in der Biokinetik der einzelnen Patienten deutlicher und die Dosiswerte unterlagen keiner Normalverteilung. Zu den Zeitpunkten t_5 , t_6 und t_7 betrug die Energiedosis im Blut im Median 71 mGy (min.: 52 mGy, max.: 129 mGy), 80 mGy (min.: 61 mGy, max.: 144 mGy) und 88 mGy (min.: 69 mGy, max.: 155 mGy). Die Gesamtdosis war zum letzten Abnahmezeitpunkt t_7 bei allen Patienten zu mehr als 80% erreicht, mit Ausnahme von Patient LuP9. Aufgrund der verhältnismäßig hohen Dosisleistung im Blut zu diesem Zeitpunkt ($0,41 \text{ mGy h}^{-1}$) war die berechnete Gesamtdosis bei LuP9 nur zu 56% erreicht. Insgesamt lag die Dosisleistung im Blut, die als zeitliche Ableitung der Energiedosis im Blut (Gleichung 4.1) definiert ist, zu den Zeitpunkten t_1 bis t_7 im Mittel bei $(11,59 \pm 2,98) \text{ mGy h}^{-1}$ (t_1), $(7,83 \pm 2,11) \text{ mGy h}^{-1}$ (t_2), $(6,03 \pm 1,85) \text{ mGy h}^{-1}$ (t_3), $(4,84 \pm 1,57) \text{ mGy h}^{-1}$ (t_4), $(0,72 \pm 0,26) \text{ mGy h}^{-1}$ (t_5), $(0,29 \pm 0,14) \text{ mGy h}^{-1}$ (t_6) und $(0,14 \pm 0,10) \text{ mGy h}^{-1}$ (t_7).

Der zeitliche Verlauf der Energiedosis im Blut sowie der entsprechenden Dosisleistung im Blut ist in Abbildung 4.1A und in Abbildung 4.1B für fünf ausgewählte Patienten gezeigt. Ein typischer

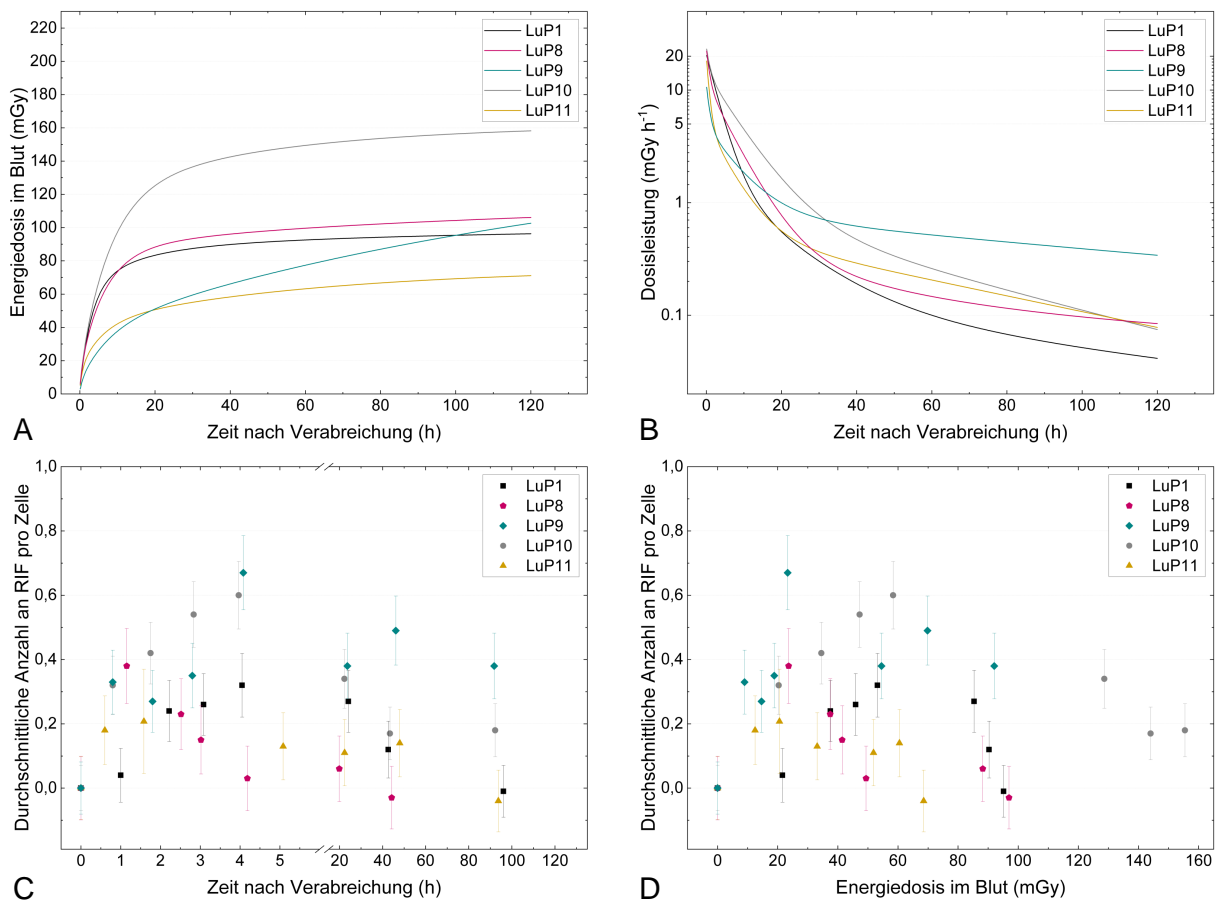


Abb. 4.1: Ergebnisse von fünf ausgewählten Patienten: ein Patient mit durchschnittlichen Parametern (LuP1); der einzige Patient, der einen direkten Rückgang der RIF zeigte (LuP8); der Patient mit der höchsten Dosisleistung zum Zeitpunkt t_7 (LuP9); der Patient mit der höchsten Energiedosis im Blut zum Zeitpunkt t_7 (LuP10) und der Patient mit der niedrigsten Energiedosis im Blut zum Zeitpunkt t_7 (LuP11). **A:** Zeitlicher Verlauf der Energiedosis im Blut. **B:** Zeitlicher Verlauf der entsprechenden Dosisleistung im Blut. **C:** Zeitlicher Verlauf der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle. **D:** Durchschnittliche Anzahl an RIF pro Zelle in Abhängigkeit von der Energiedosis im Blut. Nach [73].

zeitlicher Verlauf war bei den Patienten LuP1 und LuP8 zu beobachten, deren Gesamtdosis im Blut von 103 mGy beziehungsweise 125 mGy fast dem durchschnittlichen Wert entsprechen. Ein deutlich langsamerer und steilerer Anstieg der Energiedosis im Blut und somit eine verhältnismäßig hohe Dosisleistung auch zu späteren Zeitpunkten war bei LuP9 zu erkennen. Ein ähnlicher zeitlicher Verlauf war bei den Patienten LuP13 und LuP14 zu beobachten. Die maximale beziehungsweise minimale Energiedosis im Blut zum letzten untersuchten Zeitpunkt t_7 wurde bei LuP10 (155 mGy) beziehungsweise LuP11 (69 mGy) erreicht.

4.3.3 γ -H2AX+53BP1 Foci

Der Nullwert der Patienten lag im Mittel bei $0,32 \pm 0,11$ Foci pro Zelle. Er unterschied sich signifikant von den Foci-Werten zu den Zeitpunkten t_1 bis t_7 nach Verabreichung, wie abhängige

t -Tests zeigten. Die durchschnittliche Anzahl an RIF pro Zelle lag zu den Zeitpunkten t_1 , t_2 , t_3 , t_4 , t_5 , t_6 und t_7 im Mittel bei $0,29 \pm 0,14$, $0,39 \pm 0,15$, $0,38 \pm 0,09$, $0,38 \pm 0,17$, $0,27 \pm 0,13$, $0,21 \pm 0,14$ und $0,10 \pm 0,13$. Die individuellen Werte aller Patienten sind in Abbildung 4.2 gezeigt. Allgemein stieg die durchschnittliche Anzahl an RIF von t_1 bis t_4 an oder blieb konstant. Ein signifikanter Anstieg war von t_1 nach t_2 zu verzeichnen. Nur bei einem Patienten (LuP8) konnte ein kontinuierlicher Rückgang der durchschnittlichen Anzahl an RIF innerhalb der ersten vier Stunden nach Verabreichung beobachtet werden (Abbildung 4.1C). Nach Zeitpunkt t_4 nahm die durchschnittliche Anzahl an RIF pro Zelle bei allen Patienten signifikant ab. 96 h nach Verabreichung, zum letzten Abnahmezeitpunkt t_7 , war die durchschnittliche Anzahl an RIF pro Zelle bei sieben von 13 Patienten (LuP1, LuP2, LuP3, LuP4, LuP6, LuP11 und LuP15) auf den Nullwert zurückgegangen, während sie bei sechs Patienten (LuP7, LuP9, LuP10, LuP13, LuP14, LuP16) noch erhöht war. Der höchste Wert zu diesem Zeitpunkt konnte bei LuP9 beobachtet werden (Abbildung 4.1C).

Die Abhängigkeit der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle von der berechneten Energiedosis im Blut D_{Blut} ist in Abbildung 4.3 gezeigt. Für die ersten drei Zeitpunkte (t_0 , t_1 und t_2 ; bis 2,6 h nach Verabreichung) wurde ein linearer Zusammenhang angenommen und eine Anpassungsgerade durch die zusammengefassten Datenpunkte gelegt (Abbildung 4.3B). Der Determinationskoeffizient lag bei $r^2 = 0,58$ und die Geradengleichung ist gegeben durch:

$$\emptyset \text{ Anzahl der RIF pro Zelle} = (0,0122 \pm 0,0015) \text{ mGy}^{-1} \cdot D_{\text{Blut}} + (0,0336 \pm 0,0258) \quad (4.2)$$

Die Steigung dieser *In-vivo*-Kalibrierkurve ist in sehr guter Übereinstimmung mit der ermittelten *Ex-vivo*-Kalibrierkurve für β - und γ -Emitter (siehe Abschnitt 3.3.2). Zum Vergleich ist diese in Abbildung 4.3B zusätzlich eingezeichnet.

Die Abhängigkeit der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle von der berechneten Dosisleistung im Blut \dot{D}_{Blut} ist in Abbildung 4.4 gezeigt. Zu den letzten beiden Zeitpunkten t_6 und t_7 betrug die

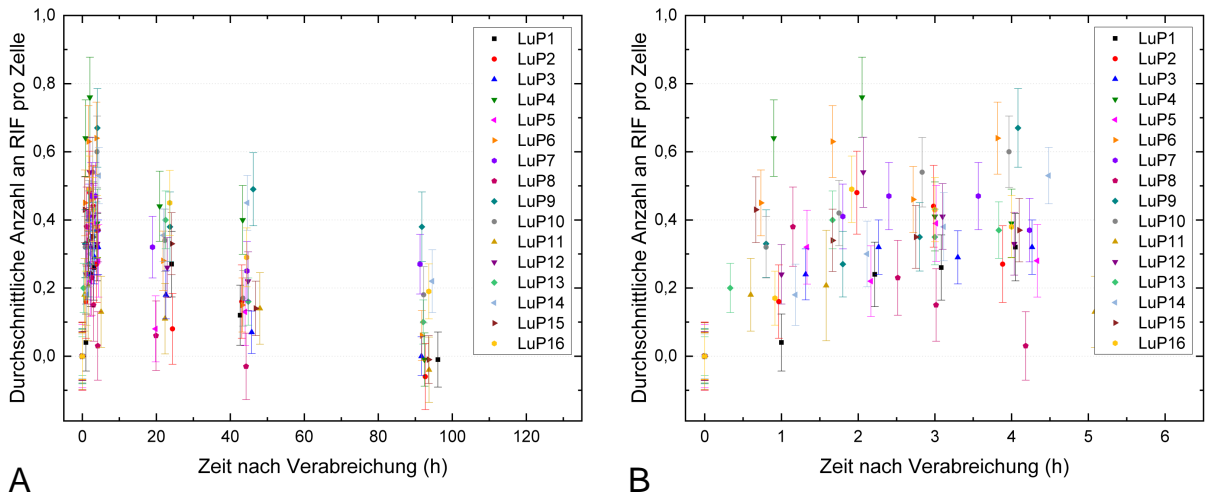


Abb. 4.2: Zeitlicher Verlauf der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle nach Verabreichung von [^{177}Lu]Lu-PSMA I&T. **A:** Vollständige Übersicht. **B:** Detaillierter Ausschnitt der Daten zu den Zeitpunkten t_0 bis t_4 . Nach [73].

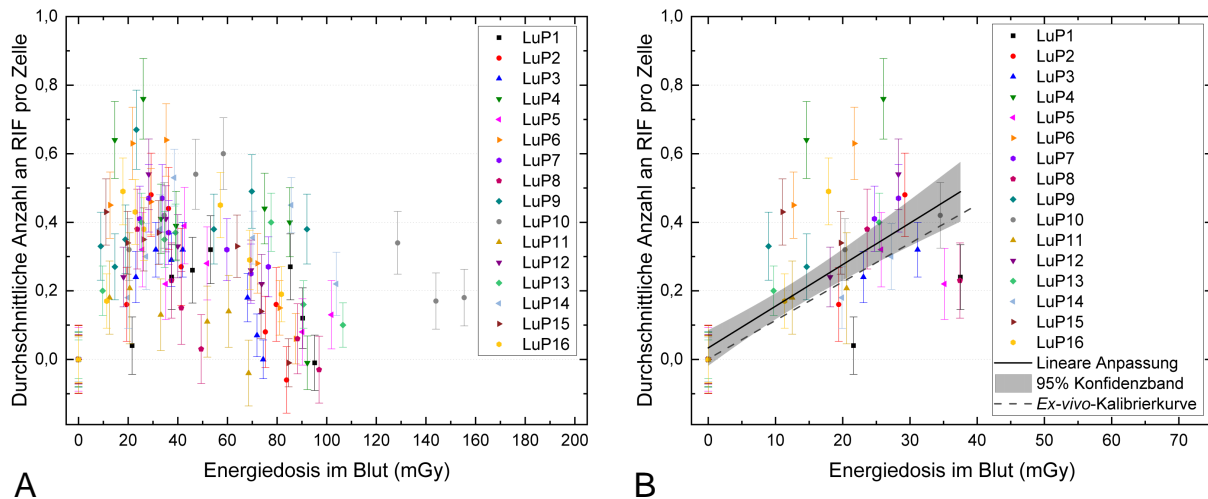


Abb. 4.3: Durchschnittliche Anzahl an RIF pro Zelle in Abhängigkeit von der Energiedosis im Blut nach Verabreichung von $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA I\&T}$. **A:** Vollständige Übersicht. **B:** Detaillierter Ausschnitt der Daten zu den Zeitpunkten t_0 bis t_2 (bis maximal 2,6 h nach Verabreichung) mit einer linearen Anpassungskurve durch die zusammengefassten Daten (durchgezogene Linie) einschließlich eines 95% Konfidenzbands (graue Fläche). Zum Vergleich ist zusätzlich die *Ex-vivo*-Kalibrierkurve (siehe Abschnitt 3.3.2) eingezeichnet (gestrichelte Linie). Nach [73].

Dosisleistung weniger als $0,6 \text{ mGy h}^{-1}$ (Abbildung 4.4B). Für diese Zeitpunkte wurde, unter der Annahme einer linearen Beziehung zwischen der durchschnittlichen Anzahl der noch vorhandenen RIF pro Zelle und \dot{D}_{Blut} , eine Anpassungsgerade durch die zusammengefassten Datenpunkte gelegt (Abbildung 4.4B). Die drei Patienten mit fehlenden Daten zum Zeitpunkt t_7 (LuP5, LuP8 und LuP12) wurden von der Analyse ausgeschlossen. Der Determinationskoeffizient lag bei $r^2 = 0,56$ und die Geradengleichung ist gegeben durch:

$$\emptyset \text{ Anzahl der RIF pro Zelle} = (0,6895 \pm 0,1248) \text{ h mGy}^{-1} \cdot \dot{D}_{\text{Blut}} + (-0,0066 \pm 0,0236) \quad (4.3)$$

Übereinstimmend mit diesem Ergebnis ergab eine Korrelationsanalyse eine signifikante positive Korrelation zwischen der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle und der Dosisleistung im Blut zu den Zeitpunkten t_6 ($r = 0,642$; $p = 0,007$) und t_7 ($r = 0,705$; $p = 0,007$).

4.3.4 Korrelationen mit klinischen Parametern

Um eine mögliche Verbindung zwischen den klinischen Parametern der Patienten und dem Verlauf der Energiedosis im Blut beziehungsweise der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle zu testen, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Diese ergaben eine signifikante positive Korrelation zwischen dem PSA-Wert vor Therapie und $\dot{D}_{\text{Blut}}(t_7)$ ($n = 13$; $\rho = 0,819$; $p = 0,001$). Eine schwächere, aber dennoch signifikante Korrelation konnte außerdem zwischen dem PSA-Wert nach Therapie und $\dot{D}_{\text{Blut}}(t_7)$ ($n = 13$; $\rho = 0,659$; $p = 0,014$) und zwischen dem PSA-Wert nach Therapie und der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle zum Zeitpunkt t_7 ($n = 13$; $\rho = 0,619$; $p = 0,024$) festgestellt werden. Keine signifikanten Korrelationen konnten zwischen der Anzahl der Knochenmetastasen und $\dot{D}_{\text{Blut}}(t_7)$ beziehungsweise der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle

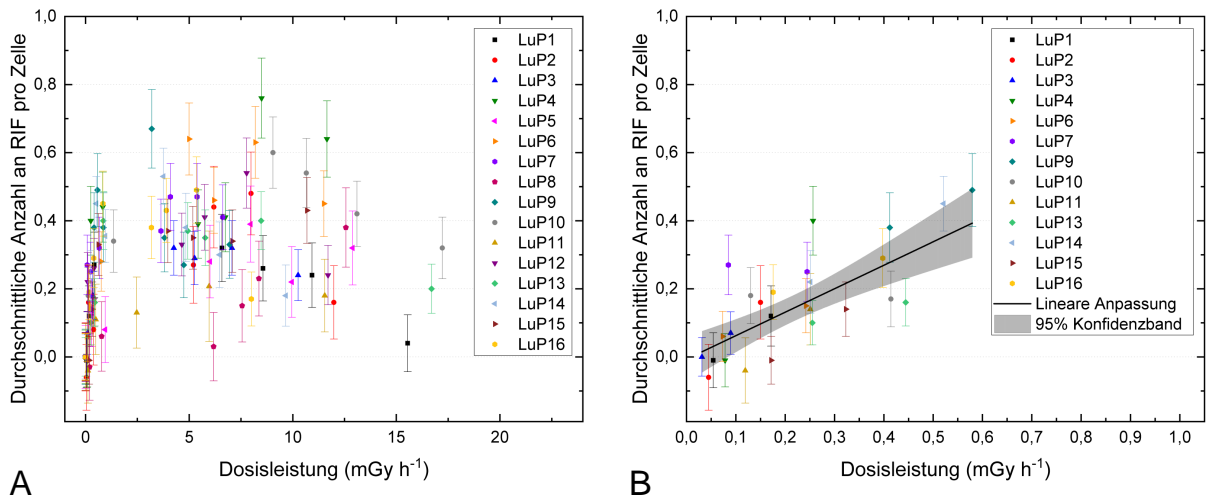


Abb. 4.4: Durchschnittliche Anzahl an RIF pro Zelle in Abhängigkeit von der Dosisleistung im Blut nach Verabreichung von $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA}$ I&T. **A:** Vollständige Übersicht. **B:** Detaillierter Ausschnitt der Daten zu den Zeitpunkten t_6 bis t_7 (48 h und 96 h nach Verabreichung) mit einer linearen Anpassungskurve durch die zusammengefassten Daten (durchgezogene Linie) einschließlich eines 95% Konfidenzbands (graue Fläche). Die Daten der drei Patienten (LuP5, LuP8 und LuP12) mit fehlenden t_7 -Werten wurden von der Analyse ausgeschlossen und sind nicht gezeigt. Nach [73].

zum Zeitpunkt t_7 gefunden werden. Auch Nierenfunktionsparameter (Kreatinin- und MAG3-Werte vor Therapie) korrelierten nicht mit $\dot{D}_{\text{Blut}}(t_7)$ beziehungsweise der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle zum Zeitpunkt t_7 .

4.4 Zusammenfassung und Diskussion

Im Rahmen dieser Studie wurde erstmalig die zeit- und dosisabhängige Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in PBMCs von Patienten während ihrer ersten Therapie mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA}$ I&T untersucht. Zur Quantifizierung der strahlungsinduzierten Doppelstrangbrüche wurde der $\gamma\text{-H2AX}+53\text{BP1}$ -Assay verwendet.

Allgemein war ein Anstieg der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle während der ersten Stunden nach Therapiebeginn zu verzeichnen, gefolgt von einem Rückgang zu späteren Zeitpunkten. Dieses zeitabhängige Verhalten gleicht dem Verlauf der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle in PBMCs von Patienten während Radioiodtherapie [5, 11] und während Therapie mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTATATE}/\text{DOTATOC}$ [10]. Im Gegensatz zur externen Bestrahlung, wie beispielsweise in der Strahlentherapie, ist die interne Exposition während nuklearmedizinischer Therapien charakterisiert durch eine kontinuierliche Bestrahlung mit abnehmender Dosisleistung. Durch die abnehmende Dosisleistung ist der beobachtete Rückgang der RIF trotz weiterhin ansteigender Energiedosis im Blut an den Folgetagen nach Therapiebeginn zu erklären. Während in den ersten Stunden nach Verabreichung des Radiopharmakons die Induktion der Doppelstrangbrüche überwiegt, dominiert zu späteren Zeitpunkten ihre Reparatur. Eine weitere mögliche Erklärung für den Rückgang der RIF im Therapieverlauf liegt in der bevorzugten Eliminierung geschädigter Zellen. Studien zeigten,

dass Photonenbestrahlung von Blutproben *ex vivo* mit hoher Dosisleistung den apoptotischen Zelltod induzieren kann [77, 78]. Auch in Blutzellen von Göttinger Minischweinen, die einer 49 Gy-Teilkörperexposition durch ^{60}Co - γ -Strahlung ausgesetzt waren, konnte eine erhöhte Anzahl an Apoptosen festgestellt werden [79]. In den hier untersuchten PBMCs der Patienten wurden jedoch nur gelegentlich apoptotische Zellen registriert und die Energiedosis und die Dosisleistung waren vergleichsweise sehr niedrig. Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass eine bevorzugte Eliminierung geschädigter Zellen den beobachteten Rückgang der RIF maßgeblich beeinflusst hat.

Nach der Verabreichung von $(5,9 \pm 0,2)$ GBq ^{177}Lu Lu-PSMA I&T lag die gesamte Energiedosis im Blut im Mittel bei (109 ± 28) mGy. 48 h nach Verabreichung war ein Median von 80 mGy (min.: 61 mGy, max.: 144 mGy) erreicht. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Eberlein *et al.*, die eine Energiedosis im Blut von (79 ± 16) mGy 48 h nach Verabreichung von $(7,2 \pm 0,4)$ GBq ^{177}Lu Lu-DOTATATE/DOTATOC berechneten [10]. Die Gesamtdosis konnte von Eberlein *et al.* nicht bestimmt werden, da keine Daten zu späteren Zeitpunkten (> 48 h nach Verabreichung) vorlagen [10].

Der Anstieg der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle mit steigender Energiedosis im Blut D_{Blut} in den ersten 2,6 h nach Verabreichung (Zeitpunkte t_0 , t_1 und t_2) konnte durch eine lineare Anpassungsgerade beschrieben werden. Ein entsprechender linearer Zusammenhang war auch in den ersten zwei Stunden nach Verabreichung von ^{131}I [11] und bis zu fünf Stunden nach Verabreichung von ^{177}Lu Lu-DOTATATE/DOTATOC [10] erkennbar. Die hier ermittelte Steigung der linearen Anpassungskurve von $(0,0122 \pm 0,0015)$ mGy $^{-1}$ stimmt sehr gut mit den von Eberlein *et al.* bestimmten Steigungswerten von $(0,0117 \pm 0,0006)$ mGy $^{-1}$ für ^{131}I [11] und von $(0,0127 \pm 0,0009)$ mGy $^{-1}$ für ^{177}Lu Lu-DOTATATE/DOTATOC [10] überein. Des Weiteren entspricht die Steigung im Rahmen des angegebenen Fehlerintervalls der in dieser Arbeit ermittelten Steigung der *Ex-vivo*-Kalibrierkurve für β - und γ -Emitter (siehe Kapitel 3.3.2), was die Vergleichbarkeit zwischen der gewählten Bestrahlung *ex vivo* und der *In-vivo*-Bestrahlung im Patienten während der ersten Stunden nach Therapiebeginn bestätigt.

Während die durchschnittliche Anzahl an RIF pro Zelle innerhalb der ersten Stunden nach Verabreichung mit der Energiedosis im Blut D_{Blut} korreliert, ist die entsprechende Dosisleistung \dot{D}_{Blut} der entscheidende Faktor für deren Verlauf zu späteren Zeitpunkten, 48 h und 96 h nach Verabreichung. Zu diesen Zeitpunkten war ein linearer Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle und \dot{D}_{Blut} erkennbar. Patienten, bei welchen \dot{D}_{Blut} zu den Zeitpunkten t_6 und t_7 verhältnismäßig hoch war, weisen folglich entweder langsamere Reparaturkinetiken auf oder eine auch zu späten Zeitpunkten erhöhte Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen. Besonders deutlich wird dieser Zusammenhang am Beispiel von Patient LuP9: Er zeigte zu den Abnahmezeitpunkten ≥ 48 h die höchste Dosisleistung und höchste Anzahl an RIF. Eine Abhängigkeit der Anzahl der RIF von der Dosisleistung berichten auch Lassmann *et al.*, die Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom während Radioiodtherapie untersuchten [5]. In anderen Studien, die den Verlauf von γ -H2AX- und/oder 53BP1-Foci während Radionuklidtherapien untersuchten, wurden Abhängigkeiten von der Dosisleistung nicht betrachtet [10, 11, 80, 81].

Eine Verbindung zwischen der Dosisabhängigkeit während der ersten Stunden nach Verabreichung und der Abhängigkeit von der entsprechenden Dosisleistung zu späteren Zeitpunkten nach Therapiebeginn und somit eine vollständige Beschreibung des Verlaufs der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle könnte zukünftig durch eine Modellierung der zeit- und dosisabhängigen

Induktion und Abnahme erreicht werden. Diese könnte auch dazu beitragen, patientenspezifische Unterschiede besser zu beschreiben und zu verstehen. Entsprechende Modellierungen nach externer [50, 51] sowie interner [10, 11] Bestrahlung zeigten, dass der Rückgang der Foci als Funktion der Zeit als zweiphasiger Prozess durch eine biexponentielle Funktion beschrieben werden kann (vergleiche Kapitel 2.5.2).

Insbesondere zu späteren Zeitpunkten im Therapieverlauf zeigte sich eine hohe Variabilität der Daten der individuellen Patienten, die sich in einer breiteren Verteilung der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle und einer schwächeren Korrelation für die *In-vivo*-Kalibrierkurve im Vergleich zu den bereits diskutierten, ähnlichen Studien [10, 11] widerspiegelt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der vergleichsweise längeren medizinischen Vorgeschichte und die damit einhergehenden umfangreichen und individuell sehr unterschiedlichen Vorbehandlungen der Prostatakarzinom-Patienten liegen.

Um einen Zusammenhang zwischen klinischen Endpunkten und der variablen Effektivität der DNA-Reparatur beziehungsweise des unterschiedlichen Verlaufs der Energiedosis im Blut zu finden, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt, die signifikante Korrelationen zwischen der durchschnittlichen Anzahl an RIF zum Zeitpunkt t_7 beziehungsweise $\dot{D}_{\text{Blut}}(t_7)$ und den PSA-Werten ergaben. Bei Patienten, bei welchen höhere PSA-Konzentrationen im Serum gemessen wurden, war die Dosisleistung im Blut und die durchschnittliche Anzahl an RIF pro Zelle 96 h nach Verabreichung signifikant erhöht. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass durch Auswertung bestimmter klinischer Parameter Rückschlüsse auf den individuellen Verlauf der Energiedosis sowie die individuelle Effektivität der DNA-Reparatur gezogen werden könnten. Aufgrund der verhältnismäßig geringen Anzahl an Daten für die Korrelationsanalyse ($n = 13$) sind die Ergebnisse dieser Studie jedoch ausschließlich als erste Hinweise für diesen Zusammenhang zu werten. Um die Ergebnisse zu validieren und mögliche Störfaktoren, wie beispielsweise den Einfluss der stark variierenden Vorbehandlungen der Patienten, auszuschließen, müssten zukünftig gezielte Untersuchungen mit einer weitaus höheren Patientenzahl durchgeführt werden.

5 Zeit- und Dosisabhängigkeit von DNA-Schäden während PET/CT-Diagnostik mit [⁶⁸Ga]Ga-PSMA

5.1 Einleitung

PSMA-Liganden können nicht nur mit zu therapeutischen Zwecken eingesetzten β^- -Emitttern markiert werden, sondern auch mit β^+ -Emitttern, welche in der nuklearmedizinischen Diagnostik verwendet werden. Die PET/CT-Untersuchung mit PSMA-Liganden ist eine nichtinvasive Technik der Bildgebung, die in der Diagnostik des Prostatakarzinoms steigenden Einsatz findet.

Unter Verwendung des γ -H2AX-Assays wurden DNA-Schäden im Blut von Patienten nach diagnostischen PET(/CT)-Untersuchungen bisher nur in wenigen Studien und bislang ausschließlich nach Verabreichung des Radiopharmakons [¹⁸F]Fluordesoxyglucose (FDG) untersucht [82–86], nicht aber nach Applikation von PSMA-Liganden. Des Weiteren konnte in keiner der bereits veröffentlichten Studien eine Beziehung zwischen der Schadensinduktion und der Energiedosis hergestellt werden [82–86]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Zeit- und Dosisabhängigkeit der Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in PBMCs von Prostatakarzinom-Patienten während PET/CT-Diagnostik mit [⁶⁸Ga]Ga-PSMA untersucht werden. Neben der Berechnung der durch das [⁶⁸Ga]Ga-PSMA resultierenden Energiedosis im Blut und der Quantifizierung der dadurch induzierten DNA-Doppelstrangbrüche sollte dabei auch zusätzlich der Einfluss der CT und des iodhaltigen Kontrastmittels untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Studie wurden 2020 in „Cancers“ veröffentlicht [87].

5.2 Methoden

5.2.1 Patienten

15 Prostatakarzinom-Patienten, die diagnostische PET/CT-Untersuchungen mit [⁶⁸Ga]Ga-PSMA erhielten, wurden in die Studie eingeschlossen. Indikationen für die Untersuchungen waren Staging beziehungsweise Restaging, PSA-Rezidiv oder progredienter Krankheitsverlauf. Die intravenöse Verabreichung einer Standardaktivität von 150 MBq des mit ⁶⁸Ga markierten PSMA-Liganden (PSMA I&T, SCINTOMICS GmbH) erfolgte etwa eine Stunde vor dem PET/CT-Scan (Biograph mCT, Siemens Healthineers). Das Ende der Injektion wurde als Start- und Referenzzeitpunkt für diese Studie gewählt. Allen Patienten wurden zudem 10 mg Furosemid (Lasix®, Sanofi-Aventis) oral verabreicht, um die Energiedosis in der Blase zu reduzieren, sowie 30 ml Peritrac® (Dr. Franz Köhler GmbH), um den CT-Kontrast im Verdauungstrakt zu erhöhen. Direkt vor dem CT-Scan wurde 1 ml

pro Kilogramm Körpergewicht eines iodhaltigen Kontrastmittels (Ultravist®-370, Bayer) injiziert. Der CT-Scan wurde bei einer Spannung von 120 kV und mit einem Röhrenstrom-Zeit-Produkt von 210 mA s als Referenz unter Verwendung einer Anatomie-basierten Röhrenstrommodulation (Care Dose) durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Niedrigdosis-CT des Thorax bei 120 kV und 80 mA s.

5.2.2 Blutentnahmen und Dosisleistungsmessungen

Blutproben wurden vor Verabreichung des Radiopharmakons (Zeitpunkt t_0 , zur Bestimmung des individuellen Nullwerts) und nominell 15 min nach Verabreichung (t_1), direkt vor der PET/CT-Untersuchung (t_2 ; etwa 60 min nach Verabreichung), direkt nach der PET/CT-Untersuchung (t_3), und 90 min bis 120 min nach dem Scan (t_4) entnommen. Für die Blutentnahmen wurden Li-Heparin Blutentnahmeröhrchen (S-Monovette®, Sarstedt) verwendet. Direkt nach der Entnahme wurden die Blutproben wie in 2.5.3 beschrieben für die Auswertung mittels des γ -H2AX+53BP1-Assays aufbereitet. Ein Teil jeder Blutprobe wurde zur Bestimmung der Aktivitätskonzentration im Blut im Germanium-Detektor gemessen, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben.

Zur Bestimmung des Aktivitätsverlaufs im Ganzkörper wurden, wie in Kapitel 2.3.3 erläutert, wiederholt Messungen der Dosisleistung durchgeführt. Die insgesamt drei bis vier Messungen erfolgten in der Regel direkt vor oder direkt nach der jeweiligen Blutentnahme. Die erste Messung, die, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, zur Normierung aller Werte verwendet wurde, erfolgte vor der ersten Miktion und Defäkation.

5.2.3 Berechnung der Energiedosis im Blut

Die Berechnung der Energiedosis im Blut erfolgte wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben. Gleichung 2.17 wurde mit den S-Werten für ⁶⁸Ga und, zur besseren Übersicht, mit $t_D = t$ verwendet:

$$D_{\text{Blut}}(t) = A_0 \cdot \left(425 \frac{\text{Gy ml}}{\text{GBq h}} \cdot \tau_{\text{Blut}}(t) + \frac{0,0459 \text{ Gy kg}^{2/3}}{wt^{2/3}} \frac{\text{Gy kg}^{2/3}}{\text{GBq h}} \cdot \tau_{\text{GK}}(t) \right) \quad (5.1)$$

Zur Berechnung des S-Wertes für die Selbstbestrahlung des Blutes wurden die von Eckerman und Endo publizierten Zerfallsdaten verwendet [29]. Die TIACs τ_{Blut} und τ_{GK} wurden patientenspezifisch aus den Zeit-Aktivitäts-Kurven des Blutes und des Ganzkörpers (siehe Kapitel 2.4.2) nach Gleichungen 2.19 und 2.20 berechnet.

Die nach Gleichung 5.1 berechnete Energiedosis im Blut $D_{\text{Blut}}(t)$ bezieht sich ausschließlich auf den Beitrag des verabreichten ⁶⁸Ga. Der zusätzliche Beitrag durch die CT ist hierbei nicht berücksichtigt. Die entsprechende Dosisleistung im Blut $\dot{D}_{\text{Blut}}(t)$ ist definiert als die zeitliche Ableitung der Energiedosis im Blut.

Von einer Abschätzung der Unsicherheiten der Energiedosis im Blut beziehungsweise der entsprechenden Dosisleistung, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, wurde in dieser Studie abgesehen. Die Unsicherheiten der Energiedosis im Blut beziehungsweise der entsprechenden Dosisleistung wurden bei den durchgeführten Analysen, beispielsweise der linearen Anpassung, demnach nicht berücksichtigt und die entsprechenden Fehlerbalken sind nicht aufgeführt.

5.2.4 Ex-vivo-Kalibrierung zur Abschätzung der CT-Dosis

Um den Dosisbeitrag der CT $D_{\text{Blut,CT}}$ in der Patientenstudie durch eine Kalibrierkurve abschätzen zu können, wurden ergänzende Versuchsreihen *ex vivo* durchgeführt. Dazu wurden fünf gesunden Versuchspersonen jeweils 36 ml Blut in Li-Heparin Blutentnahmeröhrchen (S-Monovette®, Sarstedt) entnommen. Bei den fünf Versuchspersonen handelte es sich um V1, V2, V3 und V4 (siehe Kapitel 3.2.1), sowie eine zusätzliche Versuchsperson V9 (männlich, 23 Jahre). Nach der Entnahme wurde das Blut in acht Proben zu je 4,5 ml aufgeteilt und dazu in 5 ml-Rundbodenröhrchen (Sarstedt) pipettiert. Um einen möglichen zusätzlichen Einfluss des iodhaltigen Kontrastmittels zu berücksichtigen, wurde direkt vor der Bestrahlung zu vier der Proben 67,5 μl des iodhaltigen Kontrastmittels (Ultravist®-370, Bayer) zugegeben, während die restlichen vier Proben mit der gleichen Menge PBS versetzt wurden. Die Konzentration des Kontrastmittels entsprach damit 15 μl pro Milliliter Blut und wurde so gewählt, dass sie, unter Annahme eines Blutvolumens von 5 l bei 75 kg Körpergewicht, mit der Kontrastmittelkonzentration im Blut der Patienten übereinstimmt.

Zur Bestrahlung im Computertomographen wurde jeweils eine Probe mit Kontrastmittel (KM) und eine Probe ohne Kontrastmittel (noKM) auf definierte Positionen auf der Patientenliege angebracht, wie in Abbildung 5.1 gezeigt. Die CT-Einstellungen wurden analog zur Patientenstudie gewählt. Die Röhrenspannung wurde konstant auf 120 kV eingestellt und nur das Röhrenstrom-Zeit-Produkt (mAs-Produkt) wurde variiert, um drei verschiedene Energiedosen $D_{\text{Blut,CT}}$ zu erreichen: D1 mit 60 mA s, D2 mit 110 mA s und D3 mit 180 mA s. Ein Probenpaar pro Versuchsperson wurde zur Bestimmung des individuellen Nullwerts unbestrahlt belassen (D0). Um das Vorgehen möglichst genau an den Ablauf der Patientenstudie anzupassen, begann die Separation der PBMCs aus den Blutproben 20 min nach der Bestrahlung im CT.

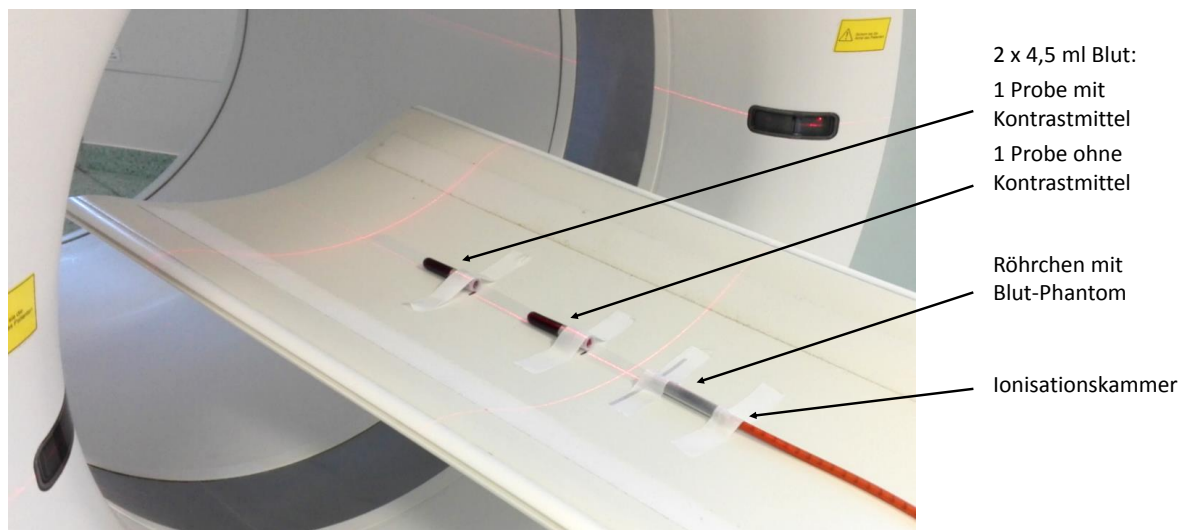


Abb. 5.1: Versuchsaufbau zur *Ex-vivo*-Bestrahlung der Blutproben im Computertomographen. Für jede Bestrahlung wurden jeweils eine Probe mit Kontrastmittel und eine Probe ohne Kontrastmittel sowie das Röhrchen mit integriertem Blut-Phantom auf definierte Positionen auf der Patientenliege angebracht. Die Ionisationskammer wurde in das Blut-Phantom eingebracht und mit dem Universaldosimeter verbunden.

Zusätzlich zu den zwei mit Blut gefüllten Rundbodenröhrchen wurde jeweils ein weiteres Röhrchen mit integriertem Blut-Phantom und einer darin angebrachten Ionisationskammer (PTW Typ 23323) zur Bestimmung der Dosis mitbestrahlt (Abbildung 5.1). Das Blut-Phantom wurde durch 3D-Druck so erstellt, dass es exakt in die verwendeten 5 ml-Rundbodenröhrchen passte und die Ionisationskammer zentral darin positioniert werden konnte. Als Material für das Phantom wurde Polyamid 12 gewählt, das eine ähnliche Dichte wie Blut hat ($1,01 \text{ g cm}^{-3}$). Die Ionisationskammer wurde mit einem kalibrierten Universaldosimeter (UNIDOS, PTW) verbunden. Bei der Ionisationskammer handelte es sich um ein Modell, das in der Strahlentherapie für Afterloading-Behandlungen im Rektum eingesetzt wird. Es kann sowohl für Messungen in Luft als auch in Flüssigkeiten eingesetzt werden. Der Messbereich der Ionisationskammer liegt zwischen 0,5 mGy und 5,8 Gy, mit einer Auflösung der Digitalanzeige von mindestens 0,5% des Messbereichs laut Herstellerangabe [88]. Vor den eigentlichen Bestrahlungen und Messungen wurde die Ionisationskammer zunächst mit 240 mA s vorbestrahlt und es wurde ein Nullabgleich durchgeführt. Nach jeder Bestrahlung konnte der unter Verwendung der „Low-dose“-Einstellung (0,5 mGy bis 58 mGy) gemessene Wert $D_{\text{Blut,CT}}$ am Dosimeter abgelesen werden.

5.2.5 γ -H2AX+53BP1-Assay

Die Quantifizierung der kolokalisierenden γ -H2AX+53BP1-Foci und Berechnung der RIF erfolgte wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Patienten

Insgesamt wurden 15 Patienten (GaP1-GaP15) in einem durchschnittlichen Alter von (71 ± 6) Jahren in die Studie eingeschlossen. Die verabreichte Aktivität lag im Mittel bei (140 ± 21) MBq $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA I\&T}$. Der angegebene Computed Tomography Dose Index (CTDI_{vol}) der Ganzkörper-CT betrug im Mittel $(14,3 \pm 2,9)$ mGy. Der CTDI_{vol} der Niedrigdosis-CT des Thorax lag bei allen Patienten bei 6,1 mGy. Die individuellen Daten der Patienten sind in Tabelle 5.1 gelistet.

Die Entnahmen der Blutproben erfolgten vor Verabreichung (t_0) und (18 ± 5) min (t_1), (56 ± 10) min (t_2), (90 ± 16) min (t_3) und (185 ± 15) min (t_4) nach Verabreichung. Aufgrund des individuellen Patientenmanagements konnten die nominellen Zeitpunkte für die Blutentnahmen und Messungen nicht immer genau eingehalten werden oder mussten in einzelnen Fällen entfallen. Zum Zeitpunkt t_2 war bei Patient GaP8 keine Blutentnahme möglich. Nicht auswertbar waren die bei Patient GaP7 zum Zeitpunkt t_2 und bei Patient GaP9 zum Zeitpunkt t_3 entnommenen Blutproben. Zwischen der Blutentnahme und dem Beginn der Verarbeitung der Blutproben, das heißt der Separation der PBMCs, vergingen durchschnittlich (8 ± 3) min. Zwischen dem CT-Scan und dem Beginn der Verarbeitung der Blutproben danach lagen im Mittel (19 ± 5) min. Für dosimetrische Berechnungen wurde immer der Beginn der Verarbeitung der Blutproben als Referenzzeitpunkt verwendet. Dieser war (24 ± 5) min (t_1), (64 ± 11) min (t_2), (101 ± 14) min (t_3) und (193 ± 15) min (t_4) nach Verabreichung.

Tab. 5.1: Demographische und klinische Daten der 15 Patienten GaP1-GaP15. Zudem ist der $CTDI_{vol}$ der Ganzkörper-CT gelistet. Der $CTDI_{vol}$ der Niedrigdosis-CT des Thorax lag bei allen Patienten bei 6,1 mGy und ist hier nicht aufgeführt.

Patienten ID	Alter (a)	Gewicht (kg)	Verabreichte Aktivität (MBq)	Gleason-Score	PSA (ng ml ⁻¹)	$CTDI_{vol}$ (mGy)
GaP1	70	79	158	4+4	10	13,45
GaP2	73	80	147	4+5	0,3	12,31
GaP3	69	113	134	4+3	0,8	18,41
GaP4	73	77	127	4+4	31	11,52
GaP5	74	77	121	4+5	100	12,42
GaP6	64	74	174	3+4	35	13,10
GaP7	73	90	110	–	0,2	14,49
GaP8	72	80	121	3+3	36	11,95
GaP9	67	118	121	4+5	33	20,15
GaP10	56	100	163	4+4	12	18,18
GaP11	73	83	175	3+4	1,9	12,96
GaP12	73	106	144	4+4	0,3	17,48
GaP13	69	87	143	4+4	1,0	14,02
GaP14	82	87	137	–	12	10,95
GaP15	81	78	118	3+4	–	12,66

5.3.2 Dosimetrie

Die durch die Verabreichung des ⁶⁸Ga resultierenden Energiedosen im Blut zu den unterschiedlichen Zeitpunkten t wurden mit Gleichung 5.1 berechnet. Zur Berechnung der patientenspezifischen TIACs $\tau_{Blut}(t)$ und $\tau_{GK}(t)$ wurden die entsprechenden Zeit-Aktivitäts-Kurven bis zum Zeitpunkt t integriert. Zur Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Aktivitätskonzentration im Blut wurden biexponentielle Fitfunktionen mit ausschließlich physikalischem Zerfall für die zweite Komponente gewählt, während zur Beschreibung der Ganzkörper-Retention monoexponentielle Fitfunktionen verwendet wurden.

Zu den Zeitpunkten t_1 , t_2 , t_3 und t_4 betrug die Energiedosis im Blut $D_{Blut}(t)$ im Durchschnitt $(1,0 \pm 0,3)$ mGy, $(1,8 \pm 0,5)$ mGy, $(2,1 \pm 0,5)$ mGy und $(2,6 \pm 0,7)$ mGy. $D_{Blut}(t_3)$ lag in allen Patienten unterhalb von 3 mGy, während $D_{Blut}(t_4)$ weniger als 4 mGy betrug. Von der Berechnung einer Gesamtdosis $D_{Blut}(\infty)$ wurde aufgrund der geringen Anzahl an Datenpunkten abgesehen.

Der zeitliche Verlauf der Energiedosis im Blut sowie der entsprechenden Dosisleistung im Blut ist in Abbildung 5.2A und in Abbildung 5.2B für einen ausgewählte Patienten (GaP14) mit durchschnittlichen Fitparametern gezeigt.

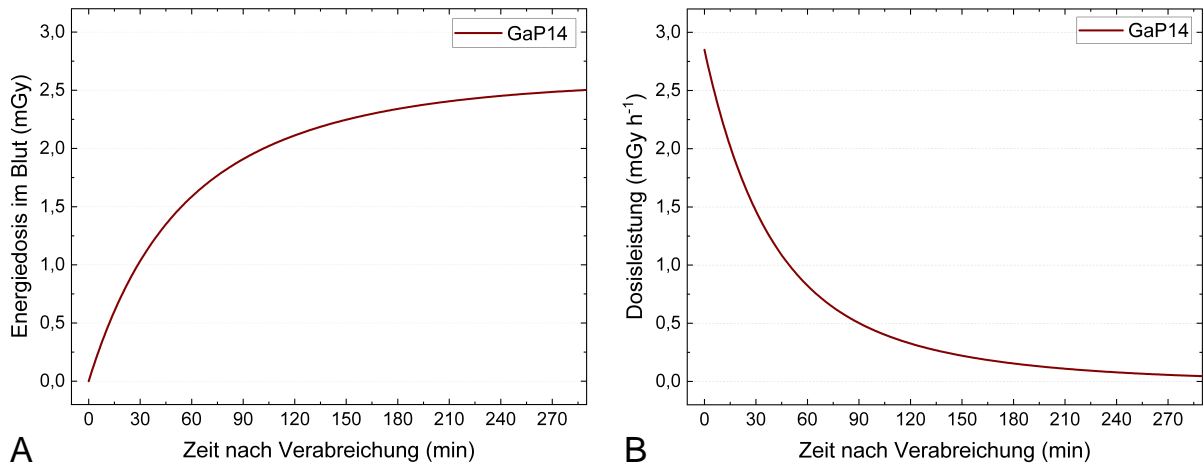


Abb. 5.2: Zeitlicher Verlauf der Energiedosis im Blut sowie der entsprechenden Dosisleistung nach Verabreichung von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA}$ I&T am Beispiel eines ausgewählten Patienten (GaP14) mit durchschnittlichen Fitparametern. **A:** Zeitlicher Verlauf der Energiedosis im Blut. **B:** Zeitlicher Verlauf der entsprechenden Dosisleistung im Blut.

5.3.3 γ -H2AX+53BP1 Foci

Der Nullwert der Patienten lag im Mittel bei $0,40 \pm 0,17$ Foci pro Zelle. Er unterschied sich signifikant von den Foci-Werten zu den Zeitpunkten t_1 bis t_4 nach Applikation, wie abhängige t -Tests zeigten. Die durchschnittliche Anzahl an Foci pro Zelle lag zu den Zeitpunkten t_1 , t_2 , t_3 und t_4 im Mittel bei $0,56 \pm 0,16$, $0,62 \pm 0,20$, $0,81 \pm 0,16$ und $0,75 \pm 0,19$, wie im Boxplot in Abbildung 5.3A dargestellt. Auch von t_1 zu t_2 und von t_2 zu t_3 war eine signifikante Zunahme der durchschnittlichen Anzahl an Foci zu verzeichnen. Von t_3 zu t_4 blieb die durchschnittliche Anzahl an Foci pro Zelle bei der Mehrheit der Patienten im Rahmen der Messunsicherheit konstant. Nur bei einem Patienten (GaP12) war eine deutliche Zunahme und bei zwei Patienten (GaP6 und GaP14) eine deutliche Abnahme zu beobachten. Der Verlauf bei GaP9 konnte aufgrund der fehlenden t_3 -Probe in dieser Hinsicht nicht ausgewertet werden. Der zeitliche Verlauf der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle ist für alle Patienten in Abbildung 5.3B gezeigt.

Die Abhängigkeit der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle von der berechneten Energiedosis im Blut D_{Blut} ist in Abbildung 5.4 gezeigt. Für die ersten drei Zeitpunkte (t_0 , t_1 und t_2 ; vor der CT-Untersuchung) wurde ein linearer Zusammenhang angenommen und eine Anpassungsgerade durch die zusammengefassten Datenpunkte gelegt (Abbildung 5.4B). Der Determinationskoeffizient lag bei $r^2 = 0,56$ und die Geradengleichung ist gegeben durch:

$$\emptyset \text{ Anzahl der RIF pro Zelle} = (0,130 \pm 0,018) \text{ mGy}^{-1} \cdot D_{\text{Blut}} + (0,011 \pm 0,020) \quad (5.2)$$

Die Steigung dieser *In-vivo*-Kalibrierkurve ist mehr als zehnfach höher im Vergleich zu der ermittelten *Ex-vivo*-Kalibrierkurve für β - und γ -Emitter (siehe Abschnitt 3.3.2) sowie der *In-vivo*-Kalibrierkurve während Therapie mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA}$ (siehe Abschnitt 4.3.3).

Die durchschnittliche Anzahl an RIF pro Zelle zu allen vier Zeitpunkten nach Verabreichung ist im Boxplot in Abbildung 5.4B gezeigt. Die entsprechenden mittleren Energiedosen im Blut sind in der Legende angegeben.

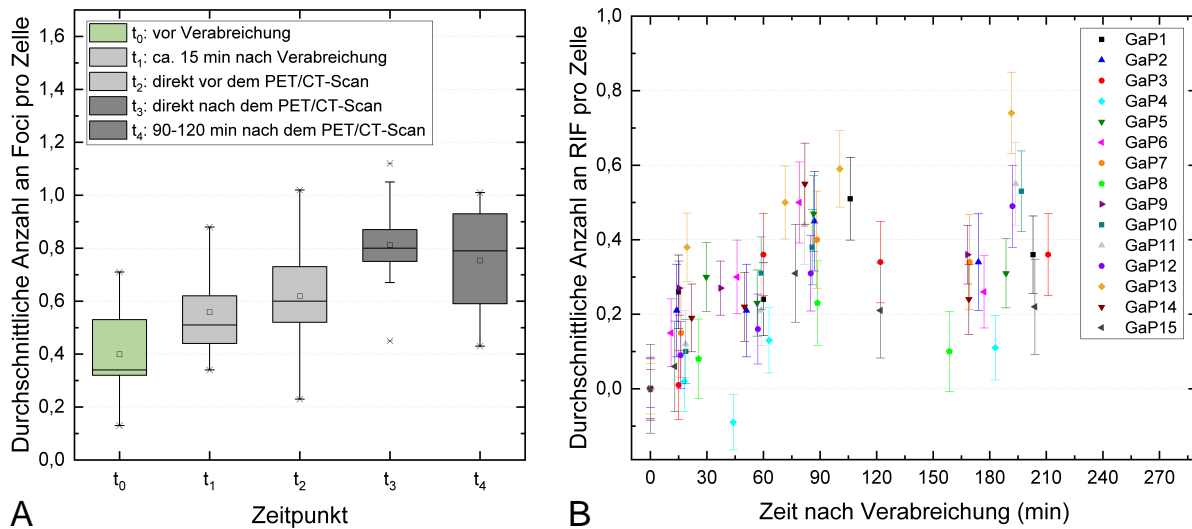


Abb. 5.3: Zeitlicher Verlauf der durchschnittlichen Anzahl an Foci beziehungsweise RIF pro Zelle nach Verabreichung von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA I\&T}$. **A:** Boxplot der durchschnittlichen Anzahl an Foci pro Zelle zu den fünf Zeitpunkten t_0 bis t_4 . Gegenüber dem Nullwert zum Zeitpunkt t_0 ist die durchschnittliche Anzahl an Foci pro Zelle zu allen Zeitpunkten nach Verabreichung signifikant erhöht. Eine signifikante Zunahme ist des Weiteren von t_1 zu t_2 und von t_2 zu t_3 zu beobachten. **B:** Verlauf der individuellen, patientenspezifischen Werte.

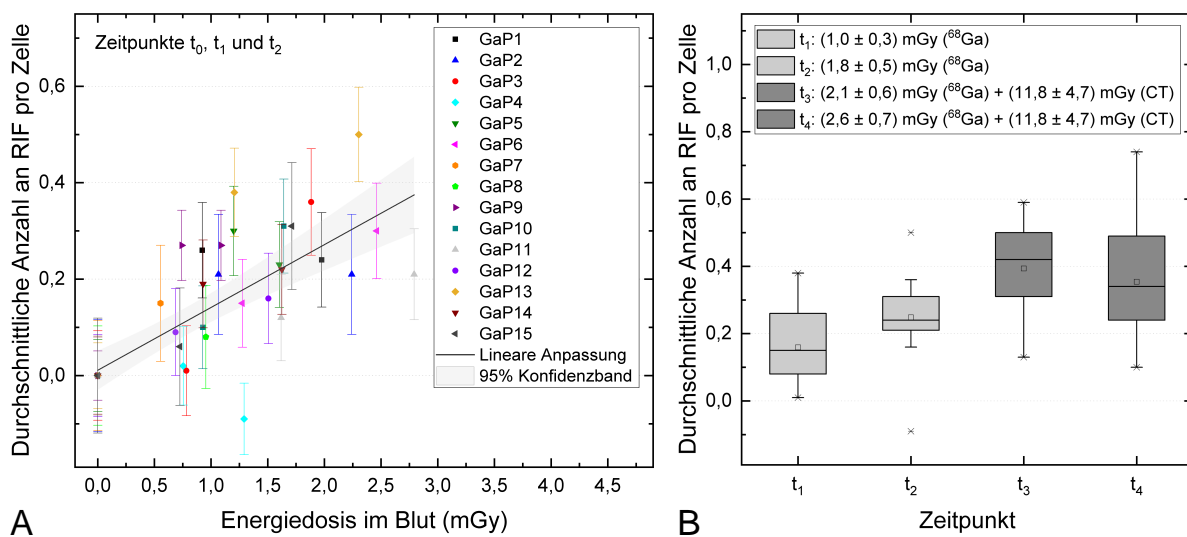


Abb. 5.4: Durchschnittliche Anzahl an RIF pro Zelle in Abhängigkeit von der Energiedosis im Blut nach PET/CT-Untersuchungen mit $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA I\&T}$. **A:** Ausschnitt der Daten zu den Zeitpunkten t_0 bis t_2 (vor dem PET/CT-Scan) mit einer linearen Anpassungskurve durch die zusammengefassten Daten (durchgezogene Linie) einschließlich eines 95% Konfidenzbands (graue Fläche). **B:** Boxplot der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle zu den vier Zeitpunkten t_1 bis t_4 . Die entsprechenden mittleren Energiedosen im Blut sind in der Legende angegeben.

5.3.4 *Ex-vivo*-Kalibrierung zur Abschätzung der CT-Dosis

Die während der *Ex-vivo*-Bestrahlung gemessenen Dosiswerte für die drei unterschiedlichen CT-Einstellungen lagen im Mittel bei $D1 = (10,6 \pm 0,5)$ mGy, $D2 = (20,3 \pm 1,1)$ mGy und $D3 = (31,2 \pm 2,1)$ mGy. In den unbestrahlten Proben (D0) lag die durchschnittliche Anzahl an Foci pro Zelle im Mittel bei $0,28 \pm 0,06$, wenn kein Kontrastmittel zugegeben wurde (noKM) und bei $0,28 \pm 0,18$ bei Kontrastmittelzugabe (KM). In den bestrahlten Proben lag die durchschnittliche Anzahl an Foci pro Zelle im Mittel bei $0,45 \pm 0,10$ (D1, noKM) und $0,46 \pm 0,09$ (D1, KM), bei $0,50 \pm 0,09$ (D2, noKM) und $0,59 \pm 0,06$ (D2, KM) und bei $0,62 \pm 0,13$ (D3, noKM) und $0,81 \pm 0,07$ (D3, KM), wie in Abbildung 5.5A dargestellt. Im Gegensatz zu allen anderen Datensätzen waren die KM-Werte bei der höchsten Dosis D3 nicht normalverteilt. In diesem Fall lag der Median der durchschnittlichen Anzahl an Foci pro Zelle bei 0,85 (min.: 0,69, max.: 0,85). Ein Vergleich der Anzahl der Foci in den Proben mit und ohne Kontrastmittel durch abhängige *t*-Tests ergab bei den Dosen D1 und D2 keine signifikanten Unterschiede. Bei der Dosis D3 zeigte der Wilcoxon-Test, dass der Unterschied in der Anzahl der Foci in den Proben mit Kontrastmittel im Vergleich zu den Proben ohne Kontrastmittel nicht signifikant war.

Die durchschnittliche Anzahl an RIF pro Zelle in Abhängigkeit von der gemessenen Energiedosis im Blut $D_{\text{Blut,CT}}$ ist in Abbildung 5.5B dargestellt. Lineare Anpassungskurven wurden durch die zusammengefassten Datenpunkte gelegt, wobei der noKM-Datensatz und der KM-Datensatz separat berücksichtigt wurden. Die Determinationskoeffizienten lagen bei $r^2 = 0,78$ (noKM) beziehungsweise $r^2 = 0,79$ (KM) und die Geradengleichungen sind gegeben durch:

$$\emptyset \text{ Anzahl der RIF pro Zelle (noKM)} = (0,010 \pm 0,001) \text{ mGy}^{-1} \cdot D_{\text{Blut,CT}} + (0,021 \pm 0,022) \quad (5.3)$$

$$\emptyset \text{ Anzahl der RIF pro Zelle (KM)} = (0,017 \pm 0,002) \text{ mGy}^{-1} \cdot D_{\text{Blut,CT}} + (0,003 \pm 0,034) \quad (5.4)$$

Durch das Akaike Informationskriterium und einen F-Test konnte nachgewiesen werden, dass sich die Steigungen der zwei Geraden signifikant unterscheiden.

Basierend auf der somit erstellten *Ex-vivo*-Kalibrierkurve für die Proben mit Kontrastmittel (Gleichung 5.4) konnte der mittlere Beitrag der CT zu der Energiedosis im Blut in der Patientenstudie auf $D_{\text{Blut,CT}} = (11,8 \pm 4,7)$ mGy abgeschätzt werden. Für diese Abschätzung wurde vereinfacht angenommen, dass die Differenz der durchschnittlichen Anzahl an RIF pro Zelle zwischen Zeitpunkt t_2 und Zeitpunkt t_3 ($\Delta\text{RIF}_{3 \rightarrow 2}$) in der Patientenstudie ausschließlich durch die Strahlung der CT verursacht wurde. Ein möglicher zusätzlicher Beitrag durch das ^{68}Ga wurde aufgrund der nur noch sehr geringen Dosisleistung zum Zeitpunkt der CT (vergleiche Abbildung 5.2) in dieser vereinfachten Abschätzung als vernachlässigbar angenommen. Das patientenspezifische $\Delta\text{RIF}_{3 \rightarrow 2}$ wurde in Gleichung 5.4 eingesetzt und der individuelle Dosisbeitrag der CT berechnet. Zwei Patienten (GaP3 und GaP15) wurden von der Analyse ausgeschlossen, da ein Rückgang der RIF nach der CT zu beobachten war, das heißt $\Delta\text{RIF}_{3 \rightarrow 2} < 0$. Drei weitere Patienten (GaP7, GaP8 und GaP9) mussten wegen fehlenden Proben zu den Zeitpunkten t_2 beziehungsweise t_3 von der Analyse ausgeschlossen werden. Bei allen anderen Patienten lag der individuelle Beitrag der CT zur Energiedosis im Blut zwischen 3,9 mGy und 19,2 mGy.

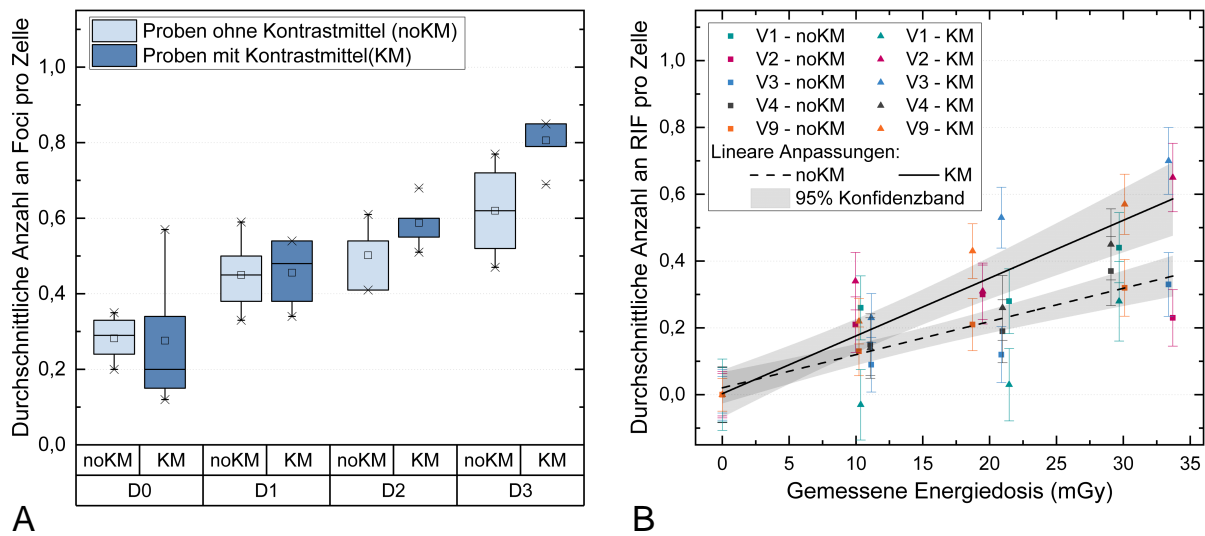


Abb. 5.5: Durchschnittliche Anzahl an Foci beziehungsweise RIF pro Zelle in *ex vivo* im Computertomographen bestrahlten Proben in Abhängigkeit von der Energiedosis im Blut und der Kontrastmittelzugabe. **A:** Boxplot der durchschnittlichen Anzahl an Foci pro Zelle nach Bestrahlung mit unterschiedlichen CT-Einstellungen resultierend in den Energiedosen D0 (keine Bestrahlung), D1 = $(10,6 \pm 0,5)$ mGy, D2 = $(20,3 \pm 1,1)$ mGy und D3 = $(31,2 \pm 2,1)$ mGy. **B:** Durchschnittliche Anzahl an RIF pro Zelle mit einer linearen Anpassungskurve durch die zusammengefassten Daten (durchgezogene Linie) einschließlich eines 95% Konfidenzbands (graue Fläche).

5.4 Zusammenfassung und Diskussion

Im Rahmen dieser Studie wurde erstmalig die zeit- und dosisabhängige Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in PBMCs von Patienten während PET/CT-Diagnostik mit $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA I\&T}$ untersucht. Zur Quantifizierung der strahlungsinduzierten Doppelstrangbrüche wurde der $\gamma\text{-H2AX}+53\text{BP1}$ -Assay verwendet.

Insgesamt konnte auch bei Energiedosen im Blut im Bereich von 0,5 mGy bis 2,8 mGy eine gegenüber dem Nullwert signifikant erhöhte Anzahl an Foci beobachtet werden. Die Steigung der für diesen Dosisbereich etablierten linearen Anpassungskurve lag mit $(0,130 \pm 0,018)$ mGy^{-1} etwa zehnfach höher im Vergleich zu der ermittelten *Ex-vivo*-Kalibrierkurve für β - und γ -Emitter (siehe Abschnitt 3.3.2) sowie den *In-vivo*-Kalibrierkurven, welche die Induktion der RIF in den ersten Stunden während Therapien mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA}$ (siehe Abschnitt 4.3.3), $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTATATE/DOTATOC}$ [10] und ^{131}I beschreiben [11]. Jedoch decken die genannten bisherigen Studien hauptsächlich den Dosisbereich zwischen 6 mGy und 100 mGy ab und enthalten keine Daten für den hier untersuchten Bereich < 3 mGy [10, 11, 73]. Das Ergebnis der etwa zehnfach höheren Steigung bei sehr niedrigen Energiedosen deutet auf eine vermehrte Induktion von Doppelstrangbrüchen in diesem Dosisbereich hin und kann als Hypersensitivität im Niedrigdosisbereich interpretiert werden. Da die Zählfehler mit abnehmender Anzahl von Ereignissen zunehmen (siehe Kapitel 2.5.3), ist die Auswertung von $\gamma\text{-H2AX}+53\text{BP1}$ -Foci in diesem sehr niedrigen Dosisbereich hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit jedoch fehleranfälliger als in höheren Dosisbereichen.

Eine etwa zehnfach erhöhte Steigung (0,10 Foci pro mGy) der dosisabhängigen γ -H2AX-Foci im Niedrigdosisbereich (< 10 mGy) berichten auch Beels *et al.*; jedoch ausschließlich für Blutproben, die mit Röntgenstrahlen bestrahlt wurden und nicht für Proben, die ^{60}Co - γ -Strahlung ausgesetzt waren [40]. Eine ähnliche Hypersensitivität im Niedrigdosisbereich wird auch in zwei anderen von Beels *et al.* veröffentlichten Studien beschrieben [89, 90]. Die Autoren schildern ein biphasisches Verhalten der Dosisreaktion: Ein steiler linearer Anstieg der γ -H2AX-Foci bis 6 mGy [89] oder 10 mGy [90], gefolgt von einem flacheren linearen Anstieg bei höheren Dosen. Auch Vandevorde *et al.* beobachteten eine Hypersensitivität im Niedrigdosisbereich als sie DNA-Schäden in den Blutzellen von pädiatrischen Patienten mittels des γ -H2AX-Assays quantifizierten [91]. Trotz sehr niedriger Energiedosen im Blut zwischen 0,14 mGy und 8,85 mGy ergab sich nach CT-Untersuchungen ein statistisch signifikanter Anstieg von 0,13 Foci pro Zelle im Median. Dieser Anstieg war deutlich höher als nach einer linearen Extrapolation des Kurvenverlaufs von höheren auf niedrigere Energiedosen zu erwarten gewesen wäre [91].

Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Anzahl an Doppelstrangbrüchen bei sehr niedrigen Dosen sind Bystander-Effekte in Zellen, die nicht direkt getroffen wurden [92]. Alternativ dazu könnte die relativ hohe Anzahl an Doppelstrangbrüchen auch mit einer verminderten Reparaturwirksamkeit bei sehr niedrigen Dosen zusammenhängen. Dies wird in mehreren Studien berichtet, welche die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in kultivierten menschlichen Fibroblasten und im Gewebe von Mäusen nach Röntgenbestrahlung untersuchten [39, 41, 93]. Eine verminderte Reparaturwirksamkeit im Niedrigdosisbereich würde zu einer Anreicherung und Persistenz der induzierten Foci führen.

Bislang gab es keine Patientenstudie, in der ein Zusammenhang zwischen DNA-Schäden und der Energiedosis im Blut nach Verabreichung von Radiopharmaka in diesem diagnostischen Niedrigdosisbereich hergestellt werden konnte, sondern hauptsächlich einige wenige Studien, welche über die Induktion von Doppelstrangbrüchen nach Verabreichung von ^{18}F]FDG berichten [82–84, 86]. May *et al.* waren die ersten, die die Induktion und den Rückgang von γ -H2AX-Foci in Patienten nach PET/CT-Untersuchungen mit ^{18}F]FDG untersuchten [82]. Sie quantifizierten γ -H2AX-Foci in den Lymphozyten von 33 Patienten nach Verabreichung von 138 MBq bis 354 MBq ^{18}F]FDG und einem oder zwei diagnostischen CT-Scans und berichten, dass ein Median von 0,11 Foci pro Zelle durch das ^{18}F]FDG induziert wurde, während die Ganzkörper-CT zu einer Induktion von 0,17 Foci im Median führte [82]. Die deutlich höhere Anzahl der durch die CT induzierten Foci steht in guter Übereinstimmung mit dieser Studie, in der ein Anstieg von 0,15 Foci pro Zelle im Median (18 ± 5) Minuten nach ^{68}Ga]Ga-PSMA I&T-Verabreichung und ein Anstieg von 0,21 Foci pro Zelle im Median als Differenz zwischen dem Zeitpunkt direkt nach dem CT-Scan (t_3) und dem Zeitpunkt direkt vor dem CT-Scan (t_2) beobachtet werden konnten. Da jedoch unterschiedliche Radiopharmaka verwendet wurden und in der Studie von May *et al.* keine Dosimetrie durchgeführt wurde, sind die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar. Zudem erschwert das unterschiedliche Vorgehen zur Isolierung und Fixierung der Blutzellen und die Tatsache, dass in der vorliegenden Studie kolokalisierende γ -H2AX+53BP1-Foci ausgewertet wurden, ebenfalls die Vergleichbarkeit der absoluten Anzahl an induzierten Foci. In einer 2020 veröffentlichten Studie konnten auch Brix *et al.* zeigen, dass die Anzahl an γ -H2AX-Foci in den Lymphozyten von gesunden Versuchspersonen nach Verabreichung von (338 ± 42) MBq ^{18}F]FDG signifikant erhöht ist [86]. Die Autoren geben an, dass die Energiedosen eine Stunde nach Injektion im Bereich

zwischen 1,5 mGy und 3,3 mGy lagen, was gut mit den in dieser Arbeit berechneten Energiedosen übereinstimmt. Ein direkter Vergleich der dosisabhängigen *In-vivo*-Induktion der Foci ist jedoch nicht möglich, da Brix *et al.* keine absoluten Foci-Werte angeben und eine Korrelation mit den berechneten Energiedosen nicht durchgeführt wurde [86].

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen fanden andere Autoren, die mittels Durchflusszytometrie γ -H2AX-Fluoreszenzintensitäten in den Lymphozyten von Patienten sowohl vor als auch nach [^{18}F]FDG-Applikation bestimmten, keine signifikanten Veränderungen [83, 84]. Schnarr *et al.* beobachteten variierende Reaktionen in den Lymphozyten von zehn Patienten [83]. Prasad *et al.* beobachteten einen Anstieg des Signals nach dem PET/CT-Scan, der jedoch aufgrund der hohen interindividuellen Variation in den 25 Patienten nicht signifikant war [84]. Dies deutet darauf hin, dass die Analyse von γ -H2AX-Fluoreszenzintensitäten mittels Durchflusszytometrie möglicherweise nicht empfindlich genug ist, um DNA-Schäden nach Expositionen im Bereich sehr niedriger Energiedosen zu bestimmen, während die Quantifizierung von γ -H2AX enthaltenden Foci auch in diesem Dosisbereich ein geeigneter Ansatz zu sein scheint.

Andere Arbeitsgruppen verwendeten den Comet-Assay, um DNA-Schäden nach PET/CT-Untersuchungen zu quantifizieren. Schmeiser *et al.* untersuchten das Blut von jeweils zehn Patienten nach Verabreichung von 206 MBq bis 254 MBq [^{18}F]FDG und auch 108 MBq bis 262 MBq [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, konnten aber keinen Anstieg der DNA-Schäden gegenüber dem Hintergrundwert beobachten. Eine Berechnung der Energiedosen im Blut erfolgte nicht [60]. Unter Verwendung des Comet- und des Mikrokern-Assays untersuchten Nautiyal *et al.* DNA-Schäden in 84 Patienten nach PET/CT-Untersuchungen mit [^{18}F]FDG und konzentrierten sich dabei auf den Einfluss des iodhaltigen Kontrastmittels, das einem Teil der Patienten zusätzlich verabreicht wurde [85]. Als Ergebnis beschreiben sie eine signifikant erhöhte Anzahl an DNA-Schäden in der Patientengruppe, der Kontrastmittel verabreicht wurde, im Vergleich zu der Patientengruppe, die kein Kontrastmittel erhielt [85]. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *Ex-vivo*-Studie überein.

Um die Induktion von DNA-Schäden in Blutzellen nach CT-Scans und insbesondere den Einfluss von iodhaltigen Kontrastmitteln sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* zu untersuchen, wurde auch der γ -H2AX-Assay in zahlreichen Studien verwendet [90, 94–101]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser *Ex-vivo*-Studie wurde in der Mehrheit der Studien eine erhöhte Anzahl an DNA-Schäden in Proben mit Kontrastmittel berichtet. Während in einigen der *Ex-vivo*-Studien beobachtet wurde, dass der Anstieg der DNA-Schäden nur bei hohen Konzentrationen der verwendeten Kontrastmittel (bis zu 50 mg ml^{-1}) oder hohen Dosen (bis zu 1 Gy) signifikant ist, jedoch nicht in einem für diagnostische Verfahren klinisch relevanten Bereich [95, 99], zeigen viele Patientenstudien, dass es bei der Anwendung von Kontrastmitteln zu einer 30 bis 107%igen Zunahme der DNA-Schäden im Vergleich zu Untersuchungen ohne Kontrastmittel kommt [96, 97, 99–101].

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *Ex-vivo*-Versuchsreihen zur Abschätzung der CT-Dosis und des Kontrastmitteleinflusses wurden die CT-Einstellungen sowie die Konzentration des Kontrastmittels möglichst genau auf die entsprechenden Parameter der Patientenstudie abgestimmt. Es wurde ein Dosisbereich zwischen 10 mGy und 30 mGy gewählt und die Kontrastmittelkonzentration wurde auf $5,5 \text{ mg ml}^{-1}$ Iod im Blut festgelegt. Insgesamt konnte eine steigende Anzahl an γ -H2AX+53BP1-Foci mit zunehmender Dosis beobachtet werden. Vergleicht

man die Steigungswerte der ermittelten *Ex-vivo*-Kalibrierkurven, so war die Steigung für die KM-Proben 1,7-mal höher als die Steigung für die noKM-Proben. Die Zunahme der DNA-Schäden nach der Verabreichung von iodhaltigen Kontrastmitteln könnte durch eine erhöhte Energiedeposition, das heißt, durch ein „dose enhancement“ verursacht werden. Harbron *et al.* führten Monte-Carlo-Simulationen durch, um „dose enhancement factors“ (DEFs) im Blut für verschiedene Blutgefäßmodelle und Iodkonzentrationen zu bestimmen [102]. Für eine Iodkonzentration von $5,0 \text{ mg ml}^{-1}$ berechneten sie einen DEF von 1,63 für den intraluminalen Teil eines Arterienmodells bei 120 kV Röhrenspannung [102]. Jost *et al.* berechneten ebenfalls DEFs für $5,0 \text{ mg ml}^{-1}$ Iod im Blut und erhielten einen DEF von 1,56 [95]. Die Ergebnisse beider Gruppen stimmen sehr gut mit den experimentellen Ergebnissen dieser Studie überein, die einen DEF von 1,7 bei $5,5 \text{ mg ml}^{-1}$ Iod im Blut nahelegen.

Der Vergleich des Beitrags der CT zur Energiedosis im Blut der Patienten, der im Durchschnitt ($11,8 \pm 4,7$) mGy betrug, und des Beitrags des ^{68}Ga von $< 4 \text{ mGy}$, lässt schließen, dass bei dieser Hybrid-Bildgebung hauptsächlich die CT zur Energiedosis im Blut beiträgt. Die Abschätzung der CT-Dosis auf Grundlage der *Ex-vivo*-Versuche ist jedoch eine Vereinfachung mit einigen Einschränkungen: Zunächst kann nicht sichergestellt werden, dass jede t_3 -Probe genau zu dem Zeitpunkt verarbeitet wurde, an dem das Maximum der durch die CT induzierten RIF erreicht wurde. Der durchschnittliche Zeitunterschied zwischen dem CT-Scan und der Verarbeitung der Blutproben betrug (19 ± 5) min, was im Allgemeinen in dem Zeitintervall liegt, in dem das Maximum der Foci nach externer Bestrahlung zu erwarten ist [37, 44, 47]. Abweichende Zeitunterschiede bei einzelnen Patienten können jedoch der Grund für die Variabilität in der Anzahl an RIF nach dem CT-Scan sein. Insbesondere die Abnahme der RIF nach der CT bei Patient GaP3 könnte damit zusammenhängen, dass die Zeit für die Induktion der Foci nicht ausreichte, da bei diesem Patienten die Zeitdifferenz zwischen dem CT-Scan und der Blutprobenverarbeitung das Minimum von nur 9 min betrug. Abgesehen davon ist bekannt, dass die Kinetik der Doppelstrangbruch-Reparatur von Patient zu Patient variiert [10, 11, 73]. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass es trotz der niedrigen Dosisleistung im Blut zum Zeitpunkt des CT-Scans (siehe Abbildung 5.2B) noch zu einer Induktion von Doppelstrangbrüchen durch das noch vorhandene ^{68}Ga kommt. Außerdem ist anzumerken, dass die durchgeführten *Ex-vivo*-Bestrahlungen nur den Dosisbereich zwischen 10 mGy und 30 mGy abdecken. Dieser Dosisbereich wurde passend zu den CTDI_{vol} -Werten einer Ganzkörper-CT mit den in dieser Studie verwendeten Einstellungen gewählt. Es ist jedoch nicht vollständig auszuschließen, dass die Anzahl der RIF im Niedrigdosisbereich höher sein könnte als nach der Extrapolation zu erwarten, wie es nach der ^{68}Ga -Exposition in dieser Studie zu beobachten war. Dies könnte zu einer Überschätzung des Beitrags der CT zur Energiedosis im Blut geführt haben. Da der Wert für die CT-Dosis allerdings gut mit dem angezeigten CTDI_{vol} des Ganzkörper-CT von ($14,3 \pm 2,9$) mGy im Durchschnitt übereinstimmt, ist dies jedoch eher unwahrscheinlich.

Insgesamt zeigt diese Studie, dass mithilfe des $\gamma\text{-H2AX}+53\text{BP1}$ -Assays strahlungsinduzierte DNA-Doppelstrangbrüche auch im Bereich sehr niedriger Energiedosen $< 3 \text{ mGy}$ nachgewiesen werden können. Das Ergebnis, dass mehr DNA-Schäden detektiert wurden als nach linearer Extrapolation des Verhaltens bei höheren Dosen erwartet, unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zur Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen nach interner Bestrahlung im Rahmen diagnostischer Untersuchungen.

6 Zeit- und Dosisabhängigkeit von DNA-Schäden während Therapie mit $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$

6.1 Einleitung

Zur Behandlung von Knochenmetastasen bei fortgeschrittenem Prostatakarzinom können auch α -Emitter eingesetzt werden. Nachdem 2013 in der ALSYMPCA-Studie gezeigt wurde, dass die Lebensdauer von Patienten durch Therapie mit $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ signifikant verlängert werden kann, führte dies zur Marktzulassung von $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ (Xofigo®) als erstes α -emittierendes Radiopharmakon zur Behandlung des metastasierten Prostatakarzinoms [21, 22].

Da bislang noch keine Daten zur Zeit- und Dosisabhängigkeit von DNA-Schäden während Therapie mit $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ vorliegen, sollten diese im Rahmen dieser Studie erhoben und mit den *Ex-vivo*-Daten aus Kapitel 3 verglichen werden.

6.2 Methoden

6.2.1 Patienten

Neun Prostatakarzinom-Patienten, die ihre erste Therapie mit $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ erhielten, wurden in die Studie eingeschlossen. Die Verabreichung einer nominellen Aktivität von 55 kBq $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ (Xofigo®, Bayer) pro Kilogramm Körpergewicht erfolgte intravenös.

6.2.2 Blutentnahmen

Blutproben wurden vor Verabreichung des Radiopharmakons (Zeitpunkt t_0 , zur Bestimmung des individuellen Nullwerts) und nominell 1,5 h (t_1), 3 h (t_2), 4 h (t_3), 24 h (t_4), 48 h oder alternativ 96 h (t_5) und vier Wochen (t_6) nach Verabreichung entnommen. Für die Blutentnahmen wurden Li-Heparin Blutentnahmeröhrchen (S-Monovette®, Sarstedt) verwendet. Direkt nach der Entnahme wurden die Blutproben wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben für die Auswertung mittels des γ -H2AX+53BP1-Assays aufbereitet. Ein Teil jeder Blutprobe wurde zur Bestimmung der Aktivitätskonzentration im Blut im Germanium-Detektor gemessen, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben.

6.2.3 Berechnung der Energiedosis im Blut

Die Berechnung der Energiedosis im Blut erfolgte wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben. Es wurde angenommen, dass die Energie aller α -Teilchen lokal im Blut deponiert wird, während der Beitrag der Elektronen und der Beitrag der γ -Strahlung vernachlässigt wurde. Für die Berechnung nach Gleichung 2.17 wurde damit ausschließlich der Beitrag der Selbstbestrahlung des Blutes durch α -Teilchen berücksichtigt und der entsprechende S-Wert aus Kapitel 3.3.3, Tabelle 3.5 verwendet. Zur besseren Übersicht wurde außerdem $t_D = t$ gesetzt:

$$D_{\text{Blut}}(t) = A_0 \cdot 15,5 \frac{\text{mGy ml}}{\text{kBq h}} \cdot \tau_{\text{Blut}}(t) \quad (6.1)$$

Der TIAC τ_{Blut} wurde patientenspezifisch aus den Zeit-Aktivitäts-Kurven des Blutes (siehe Kapitel 2.4.2) nach Gleichungen 2.19 und 2.20 berechnet.

Von einer Abschätzung der Unsicherheiten der Energiedosis im Blut, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, wurde in dieser Studie abgesehen. Die Unsicherheiten der Energiedosis im Blut wurden bei den durchgeführten Analysen demnach nicht berücksichtigt und die entsprechenden Fehlerbalken sind nicht aufgeführt.

6.2.4 γ -H2AX+53BP1-Assay

Die Quantifizierung der γ -H2AX+53BP1-Spuren erfolgte wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben. Wie in Kapitel 3.3.1 erläutert, wurden auch große Foci mit Durchmessern $> 1,1 \mu\text{m}$ als α -Spuren gezählt, da angenommen werden kann, dass es hierbei um Spuren von α -Teilchen handelt, die senkrecht zur Bildebene verliefen. Kleine, runde Foci mit Durchmessern $\leq 1,1 \mu\text{m}$ wurden für diese Studie nicht quantifiziert.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Patienten

Insgesamt wurden neun Patienten (RaP1-RaP9) in einem durchschnittlichen Alter von (71 ± 7) Jahren in die Studie eingeschlossen. Die verabreichte Aktivität lag zwischen 3,3 MBq und 5,6 MBq $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. Die individuellen Daten der Patienten sind in Tabelle 6.1 gelistet.

Aufgrund des individuellen Patientenmanagements konnten die nominellen Zeitpunkte für die Blutentnahmen nicht immer genau eingehalten werden oder mussten in einzelnen Fällen entfallen. Da es sich um eine Therapie handelt, die ambulant durchgeführt wird, und es nicht allen Patienten möglich war, an Folgetagen wiederzukommen, waren Blutentnahmen zu späten Zeitpunkten (≥ 24 h nach Verabreichung) nur bei den Patienten RaP1, RaP7, RaP8 und RaP9 möglich.

Zu den Vorbehandlungen der Patienten gehörten die operative Entfernung der Prostata, externe Strahlentherapie, Androgendeprivation und Chemotherapie.

Tab. 6.1: Demographische und klinische Daten der neun Patienten RaP1 bis RaP9.

Patienten ID	Alter (a)	Gewicht (kg)	Verabreichte Aktivität (MBq)	Gleason-Score	Anzahl der Knochenmetastasen
RaP1	63	95	5,5	9	> 50
RaP2	72	103	5,6	8	≈ 5
RaP3	76	78	4,6	9	> 50
RaP4	78	63	3,3	8	> 50
RaP5	57	85	4,6	9	> 50
RaP6	72	89	4,9	9	> 50
RaP7	72	90	4,9	9	> 20
RaP8	76	73	4,0	9	≈ 10
RaP9	70	77	4,2	7	> 200

6.3.2 Dosimetrie

Die Energiedosen im Blut zu den unterschiedlichen Zeitpunkten t wurden mit Gleichung 6.1 berechnet. Zur Berechnung des patientenspezifischen TIACs $\tau_{\text{Blut}}(t)$ wurde die entsprechende Zeit-Aktivitäts-Kurve bis zum Zeitpunkt t integriert. In Abhängigkeit von der Anzahl der Datenpunkte wurden zur Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Aktivitätskonzentration im Blut entweder mono- oder biexponentielle Fitfunktionen gewählt. Nur, wenn Daten zu mindestens zwei späten Zeitpunkten (24 h und 48 h oder 96 h nach Verabreichung) vorlagen, das heißt bei den Patienten RaP1, RaP7 und RaP8, wurden biexponentielle Fitfunktionen mit ausschließlich physikalischem Zerfall für die zweite Komponente verwendet.

Insgesamt lag die Aktivitätskonzentration in den Blutproben zwischen $0,4 \text{ Bq ml}^{-1}$ (RaP8, 96 h nach Verabreichung) und $87,4 \text{ Bq ml}^{-1}$ (RaP1, 1,5 h nach Verabreichung). 4 h nach Verabreichung war im Median noch 0,4% (min.: 0,3%, max.: 0,7%) der verabreichten Aktivität pro Liter Blut vorhanden. Nach 24 h ging dieser Wert auf 0,1% (min.: 0,04%, max.: 0,16%) zurück. Die Aktivitätskonzentration im Blut in Abhängigkeit von der Zeit nach Verabreichung ist in Abbildung 6.1A gezeigt.

Zu den Zeitpunkten 1,5 h, 3 h und 4 h nach Verabreichung betrug die Energiedosis im Blut $D_{\text{Blut}}(t)$ im Median 1,0 mGy (min.: 0,5 mGy, max.: 3,2 mGy), 1,8 mGy (min.: 0,9 mGy, max.: 4,6 mGy) und 2,1 mGy (min.: 1,2 mGy, max.: 5,2 mGy). 4 h nach Verabreichung lag die Energiedosis im Blut somit bei allen Patienten unterhalb von 6 mGy.

Die Gesamtdosis (Integration bis $t = \infty$) wurde nur für die Patienten RaP1, RaP7 und RaP8 berechnet und betrug $16,5 \text{ mGy}$ ($= 3 \text{ mGy MBq}^{-1}$) bei RaP1, $6,4 \text{ mGy}$ ($= 1,3 \text{ mGy MBq}^{-1}$) bei RaP7 und $4,0 \text{ mGy}$ ($= 1,0 \text{ mGy MBq}^{-1}$) bei RaP8. Bei allen anderen Patienten wurde aufgrund der geringen Anzahl an Datenpunkten von der Berechnung einer Gesamtdosis abgesehen.

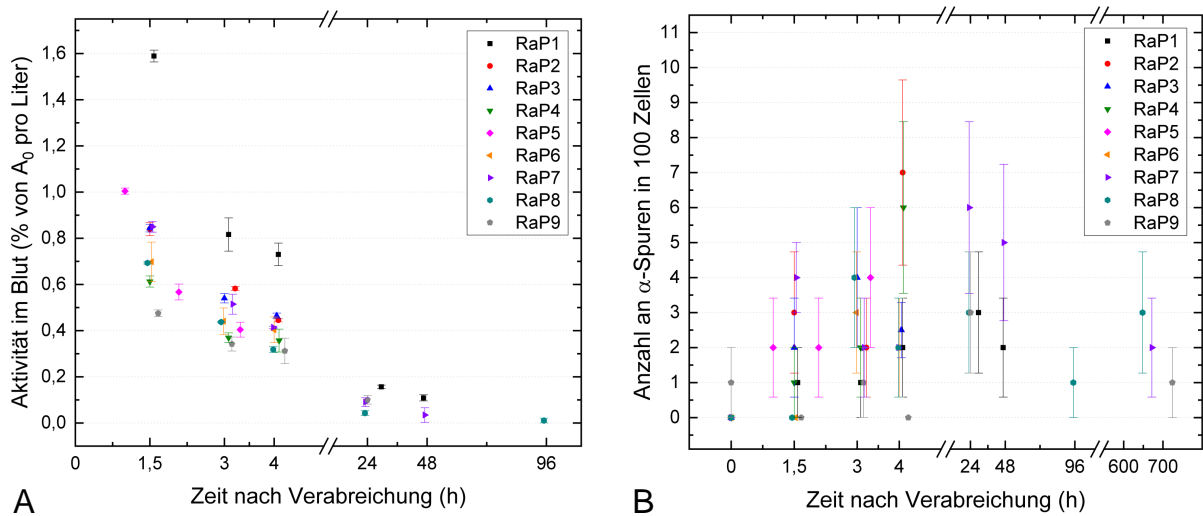


Abb. 6.1: Zeitlicher Verlauf der Aktivitätskonzentration im Blut sowie der Anzahl an α -Spuren nach Verabreichung von $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. **A:** Zeitlicher Verlauf der Aktivitätskonzentration im Blut. **B:** Zeitlicher Verlauf der Anzahl an α -Spuren in 100 Zellen.

6.3.3 γ -H2AX+53BP1 Foci

In den jeweils 100 ausgewerteten Zellen der unbestrahlten Proben ließ sich nur bei einem Patienten (RaP9) eine einzelne α -Spur nachweisen. Die unbestrahlten Proben der anderen Patienten enthielten keine α -Spuren.

In den nach Verabreichung entnommenen Proben konnten zwischen 0 und 7 α -Spuren pro 100 Zellen quantifiziert werden. Zu den Zeitpunkten 1,5 h, 3 h und 4 h nach Verabreichung betrug die Anzahl an α -Spuren in 100 Zellen im Median 1 (min.: 0, max.: 4), 2 (min.: 1, max.: 4) und 2 (min.: 0, max.: 7). Im Vergleich zum Nullwert war die Anzahl an α -Spuren 3 h ($p = 0,008$) und 4 h ($p = 0,016$) nach Verabreichung signifikant erhöht. Auch zu späteren Zeitpunkten (24 h bis zu vier Wochen nach Verabreichung) konnte eine erhöhte Anzahl an α -Spuren (min.: 1, max.: 6) nachgewiesen werden. Die individuellen Werte aller Patienten sind in Abbildung 6.1B gezeigt.

Insgesamt zeigten die α -Spuren variable Morphologien, wie in der zusammengestellten Übersicht in Abbildung 6.2 veranschaulicht. Die Spuren der α -Teilchen und in einigen Zellen auch der ganze Kern waren vorrangig durch γ -H2AX markiert, mit 53BP1-Foci beziehungsweise -Clustern entlang der Spur. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen in den *Ex-vivo*-Experimenten (siehe Kapitel 3.3.3) sowie den Ergebnissen weiterer Studien [64, 103].

Die Abhängigkeit der Anzahl an α -Spuren von der berechneten Energiedosis im Blut D_{Blut} ist in Abbildung 6.3A gezeigt. Aufgrund der geringen Anzahl an α -Spuren bei niedrigen Energiedosen und den damit verbundenen relativ großen Unsicherheiten war eine Korrelationsanalyse und damit die Erstellung einer *In-vivo*-Kalibrierkurve nicht durchführbar. In Abbildung 6.3B sind die *Ex-vivo*-Daten aus Kapitel 3.3.3 zum Vergleich mit den *In-vivo*-Daten der aktuellen Studie dargestellt. Die eingezeichnete *Ex-vivo*-Kalibrierkurve (Gleichung 3.3) bezieht sich auf den gesamten untersuchten Dosisbereich (5 mGy bis 136 mGy), zur besseren Übersicht sind jedoch ausschließlich Datenpunkte bis zu einer Energiedosis im Blut von 50 mGy dargestellt. Zudem sind ausschließlich die *In-vivo*-

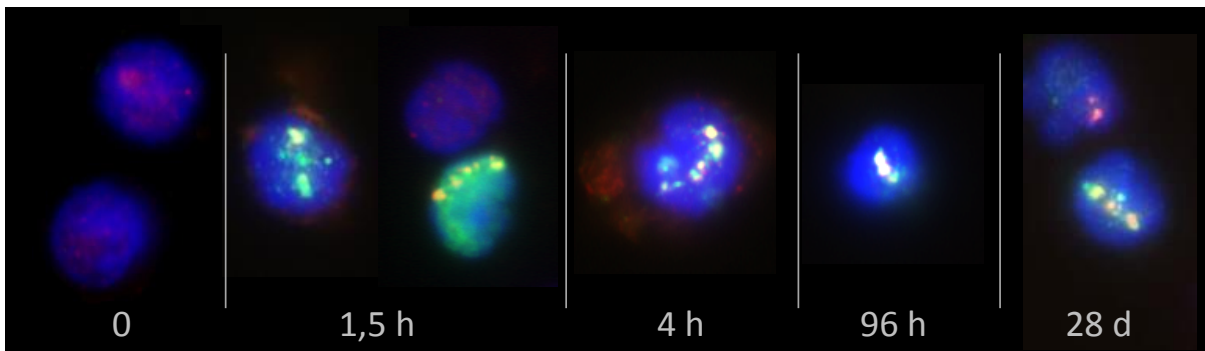


Abb. 6.2: Zusammengestellte Übersicht von Zellkernen (DAPI, blau) mit γ -H2AX+53BP1 enthaltenden α -Spuren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Verabreichung von $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. Die gezeigten Zellen stammen von verschiedenen Patienten und spiegeln die variablen Morphologien der DNA-Schadensmarker entlang der α -Spuren wider. Zum Vergleich sind links Zellkerne aus einer unbestrahlten Probe, die vor Verabreichung abgenommen wurde, ohne α -Spuren gezeigt (0). Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Harry Scherthan.

Daten bis 4 h nach Verabreichung gezeigt, da die Dauer der Bestrahlung mit dem einstündigen Bestrahlungsprozess *ex vivo* vergleichbar ist. Verglichen mit der linearen *Ex-vivo*-Kalibrierkurve scheint die Häufigkeit der α -Spuren im Dosisbereich $< 6 \text{ mGy}$ *in vivo* höher zu sein als erwartet, zeigt jedoch große patientenspezifische Variationen.

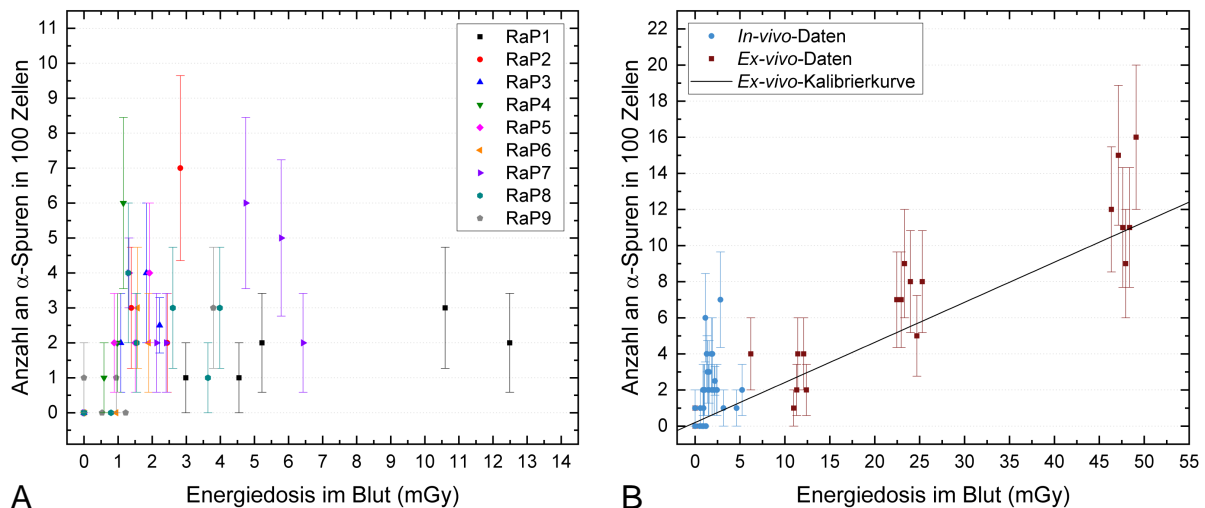


Abb. 6.3: Durchschnittliche Anzahl an α -Spuren in 100 Zellen in Abhängigkeit von der Energiedosis im Blut nach Verabreichung von $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. **A:** Vollständige Übersicht. **B:** Detaillierter Ausschnitt der Daten bis 4 h nach Verabreichung (blaue Punkte). Zum Vergleich sind zusätzlich die *Ex-vivo*-Daten bis zu einer Energiedosis im Blut von 50 mGy (dunkelrote Punkte) sowie die *Ex-vivo*-Kalibrierkurve (schwarze Linie) eingezeichnet (vergleiche Kapitel 3.3.3).

6.4 Zusammenfassung und Diskussion

Im Rahmen dieser Studie wurde erstmalig die zeit- und dosisabhängige Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in PBMCs von Patienten während ihrer ersten Therapie mit $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ untersucht. Zur Quantifizierung wurde der γ -H2AX+53BP1-Assay verwendet und mikroskopisch sichtbare Spuren der α -Teilchen, α -Spuren, wurden ausgewertet.

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen in der *Ex-vivo*-Studie (vergleiche Kapitel 3.3.3) sowie den Ergebnissen weiterer Studien [64, 103], wiesen die beobachteten α -Spuren häufig eine variable Morphologie mit γ -H2AX als verlässlichsten Marker auf.

3 h und 4 h nach Verabreichung des Radiopharmakons konnte ein signifikanter Anstieg in der Frequenz der detektierten α -Spuren gegenüber dem Nullwert festgestellt werden. Die berechneten Energiedosen im Blut lagen dabei im sehr niedrigen Dosisbereich, bei < 6 mGy bis 4 h nach Verabreichung. Die maximale Gesamtdosis betrug 16,5 mGy. Die Genauigkeit in der Dosisbestimmung ist in dieser Studie jedoch limitiert durch die geringe Anzahl an Datenpunkten sowie durch die relativ geringen Aktivitätskonzentrationen im Blut.

Hinsichtlich der Aktivitätskonzentrationen im Blut konnten große interindividuelle Unterschiede zwischen den Patienten beobachtet werden, was eine entsprechende Variation in den Werten der Energiedosis im Blut zur Folge hat. Die insgesamt schnelle Ausscheidung des $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ aus dem Blut steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Carrasquillo *et al.*, die die Pharmakokinetik und Biodistribution von $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ in zehn Patienten untersuchten [104]. Sie beobachteten, dass 4 h nach Verabreichung ein Median von 2,0% (min.: 1,6%, max.: 3,9%) der verabreichten Aktivität noch im Plasma der Patienten vorhanden war. 24 h nach Verabreichung war dieser Wert auf einen Median von 0,55% (min.: 0,37%, max.: 1,0%) gesunken. Ausgehend von einem Plasmavolumen von 3,2l und einem Verhältnis der Aktivitätskonzentration von Plasma zu Blut von 1,5, wie in der Publikation angegeben, sind 4 h beziehungsweise 24 h nach Verabreichung im Median noch 0,4% beziehungsweise 0,1% der verabreichten Aktivität pro Liter Blut im Kreislauf vorhanden [104]. Diese Werte stimmen genau mit den in dieser Arbeit erhaltenen Werten überein, was die Zuverlässigkeit der ermittelten Aktivitätskonzentrationen, die für die Bestimmung der Energiedosen verwendet wurden, unterstreicht.

Im Vergleich zu der in Kapitel 3.3.3 erstellten *Ex-vivo*-Kalibrierkurve für ^{223}Ra war die Anzahl der α -Spuren *in vivo* im Dosisbereich < 6 mGy höher als erwartet. Dieses Ergebnis könnte auf eine Hypersensitivität im Niedrigdosisbereich hinweisen, wie bereits nach Verabreichung von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA I\&T}$ für diagnostische PET/CT-Untersuchungen vermutet (vergleiche Kapitel 5.4) und auch in weiteren Studien angedeutet [89, 91]. Insbesondere aufgrund der limitierten statistischen Aussagekraft im Niedrigdosisbereich, ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Ergebnisse dieser Studie durch methodische Einschränkungen beeinflusst wurden. Darüber hinaus ist anzumerken, dass ein direkter Vergleich mit den *Ex-vivo*-Daten schwierig ist, da unterschiedliche Dosisbereiche untersucht wurden. Die *Ex-vivo*-Studie deckt den Dosisbereich zwischen 5 mGy und 136 mGy ab und enthält keine Daten für den Bereich < 5 mGy.

Bislang gibt es nur wenige weitere Studien zu biologischen Effekten nach Bestrahlung mit $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ und eine direkte Vergleichbarkeit ist aufgrund unterschiedlicher Bestrahlungsanordnungen, Zelltypen und Dosisbereiche nicht gegeben [105, 106]. In einer 2019 veröffentlichten Studie untersuchten Runge *et al.* DNA-Schäden in Lymphozyten von Prostatakarzinom-Patienten über

sechs Therapiezyklen mit $^{223}\text{Ra}] \text{RaCl}_2$ [107]. Dafür quantifizierten sie $\gamma\text{-H2AX-Foci}$ vor jedem Zyklus, analysierten aber nicht die Induktion von Doppelstrangbrüchen während der einzelnen Therapiezyklen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit beobachteten Runge *et al.* vier Wochen nach der Behandlung, vor dem nächsten Therapiezyklus, keine α -Spuren und schließen auf eine fast vollständige DNA-Reparatur [107]. Die in dieser Arbeit beobachtete geringe, aber dennoch erhöhte Anzahl an α -Spuren in den wenigen späten Proben (24 h bis vier Wochen nach Verabreichung) deuten jedoch auf eine möglicherweise unvollständige oder gehemmte DNA-Reparatur in einigen zirkulierenden PBMCs hin. Generell gelten von α -Teilchen induzierte DNA-Schäden als besonders komplex und schwierig zu reparieren [108, 109], was zu einer Persistenz der DNA-Schadensspuren in langlebigen PBMCs führen könnte. Weitere Untersuchungen zu DNA-Reparaturfaktoren und -wegen, die entlang der α -Spuren in der DNA aktiv sind, könnten zu einem genaueren Verständnis der Reparaturprozesse beitragen, wie Untersuchungen mit hochauflösender Lichtmikroskopie [64, 110] oder Transmissionselektronenmikroskopie [111, 112] zeigen.

Stephan *et al.* bestimmten die Häufigkeit von Chromosomenaberrationen und die Energiedosis im Blut bei Patienten mit Morbus Bechterew, die mit $^{224}\text{Ra}] \text{RaCl}_2$ behandelt wurden [113]. Die Patienten erhielten 10 Injektionen von je 1 MBq wöchentlich, resultierend in einer Gesamtaktivität von 10 MBq. Stephan *et al.* konnten zeigen, dass die Anzahl der dizentrischen Chromosomen von der Energiedosis im Blut abhängt und mit jeder Injektion ansteigt [113]. Aufgrund der unterschiedlichen biologischen Endpunkte, und da in dieser Arbeit nur der erste Therapiezyklus mit bis zu 5,6 MBq $^{223}\text{Ra}] \text{RaCl}_2$ untersucht wurde, ist ein Vergleich mit den Ergebnissen dieser Studie nicht direkt möglich. Da die *Ex-vivo*-Studien mit ^{223}Ra und ^{224}Ra jedoch gezeigt haben, dass die Induktion von α -Spuren für beide Radiumisotope identisch ist (siehe Kapitel 3.3.3), ist eine ähnliche Zeit- und Dosisabhängigkeit für beide Isotope auch *in vivo* zu erwarten.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Studie gezeigt werden, dass der $\gamma\text{-H2AX+53BP1}$ -Assay geeignet ist, auch im sehr niedrigen Dosisbereich DNA-Schäden nach interner Bestrahlung mit α -Emittern nachzuweisen. Wesentliche Limitationen dieser Studie sind jedoch die geringe Anzahl an eingeschlossenen Patienten und die begrenzte Anzahl an Daten zu späteren Zeitpunkten nach Therapiebeginn. Durch diese Einschränkungen war es nicht möglich, Korrelationen zwischen den induzierten DNA-Schäden und der Energiedosis im Blut sowie klinischen Parametern zu untersuchen. Des Weiteren bedingt die geringe Anzahl an detektierten α -Spuren (≤ 7 in 100 Zellen) verhältnismäßig große Unsicherheiten, da die Zählfehler mit abnehmender Anzahl von Ereignissen zunehmen. Zukünftig könnte eine Automatisierung der Auswertung es ermöglichen, eine größere Anzahl an Zellen auf α -Spuren zu untersuchen und damit statistische Unsicherheiten zu reduzieren. Damit könnte sich der Assay sowohl in Unfallszenarien als auch zur Abschätzung von DNA-Schäden während Radionuklidtherapien, auch bei Verwendung neuer α -emittierenden Radiopharmaka, als nützlich erweisen.

7 Zusammenfassung

In der Nuklearmedizin werden radioaktive Substanzen eingesetzt, um zu therapeutischen Zwecken gezielt bösartiges Gewebe zu zerstören oder in diagnostischen Anwendungen Stoffwechselfvorgänge bildlich darzustellen. Die ionisierende Strahlung der eingesetzten Radionuklide kann jedoch auch DNA-Schäden in gesunden Zellen verursachen. DNA-Doppelstrangbrüche gehören dabei zu den kritischsten Läsionen, da sie schwer zu reparieren sind und eine fehlerhafte Reparatur zu Mutationen oder zum Zelltod führen kann. Während Radionuklidtherapien ist daher in Risikoorganen darauf zu achten, dass die deponierte Energie pro Masse, die Energiedosis, bestimmte Werte nicht überschreitet. Zu diesen Risikoorganen gehört auch das blutbildende System. Da eine Abschätzung der Energiedosis im Knochenmark häufig über die Bestimmung der Energiedosis im Blut als Surrogat erfolgt, ist deren Kenntnis von besonderem Interesse.

In dieser Arbeit wurden daher Berechnungen der Energiedosis im Blut nach interner Bestrahlung durchgeführt und die Ergebnisse mit der Anzahl an strahlungsinduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen in PBMCs korreliert. Zur Quantifizierung der DNA-Schäden wurden die Biomarker γ -H2AX und 53BP1 verwendet, die nach Entstehung eines Doppelstrangbruchs um diesen akkumulieren und sich durch Immunfluoreszenzfärbung als mikroskopische Foci sichtbar machen und quantifizieren lassen. Dadurch ermöglicht der γ -H2AX+53BP1-Assay einen quantitativen Nachweis strahlungsinduzierter Doppelstrangbrüche. Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit neue Kenntnisse über die Dosisabhängigkeit von DNA-Schäden in PBMCs während interner Bestrahlung mit unterschiedlichen Radionukliden sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* gewonnen werden.

Ex-vivo-Untersuchungen haben den Vorteil, dass sie unter gleichbleibenden, gut definierten Bedingungen durchgeführt werden können und somit eine Analyse der Induktion von Doppelstrangbrüchen bei festgelegten Energiedosen und einer konstanten Bestrahlungsdauer erlauben. In dieser Arbeit wurden Blutproben von gesunden Versuchspersonen durch Zugabe von Radionukliden in bestimmten Aktivitätskonzentrationen eine Stunde lang intern bestrahlt. Für die Bestrahlung wurden die α -Emitter ^{223}Ra und ^{224}Ra , die β^- -Emitter ^{177}Lu und ^{90}Y , der β^+ -Emitter ^{68}Ga und der γ -Emitter ^{99m}Tc verwendet. Der untersuchte Energiedosisbereich lag zwischen 5 mGy und 136 mGy.

Nach der Bestrahlung von Blutproben mit β^- - beziehungsweise γ -Emittlern wurde beobachtet, dass die Anzahl der strahlungsinduzierten γ -H2AX+53BP1-Foci (RIF) in den PBMCs linear mit der Energiedosis im Blut ansteigt. Zudem zeigte sich, dass die Induktion der RIF unabhängig vom verwendeten Radionuklid und unabhängig von der Versuchsperson ist.

Nach der Bestrahlung von Blutproben mit α -Emittlern waren zusätzlich zu den nach Expositionen mit β^- - beziehungsweise γ -Emittlern beobachteten kleinen, runden Foci auch γ -H2AX+53BP1 enthaltende Spuren (α -Spuren) in den Zellkernen erkennbar, welche die Trajektorien der emittierten α -Teilchen darstellten. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl dieser α -Spuren linear mit der

Energiedosis im Blut zunimmt und damit ein geeigneter Parameter für die Biodosimetrie nach Expositionen mit α -emittierenden Radionukliden ist.

Auch *in vivo* wurde die Dosisabhängigkeit der DNA-Doppelstrangbrüche während der internen Bestrahlung durch Radionuklide mit unterschiedlichen Emissionseigenschaften untersucht. Aufgrund der neuen, vielversprechenden Entwicklungen von Radiopharmaka zur Therapie und Diagnostik des Prostatakarzinoms in den letzten Jahren wurden dafür Blutproben von Prostatakarzinom-Patienten während Therapie mit [^{177}Lu]Lu-PSMA I&T, während PET/CT-Diagnostik mit [^{68}Ga]Ga-PSMA I&T und während Therapie mit [^{223}Ra]RaCl₂ untersucht.

Während Therapie mit [^{177}Lu]Lu-PSMA I&T zeigte sich, dass die Anzahl der RIF in den ersten Stunden nach Therapiebeginn durch eine lineare Anpassungskurve angenähert werden kann, die mit der Energiedosis im Blut ansteigt, gefolgt von einem Rückgang der RIF zu späteren Zeitpunkten, der durch die DNA-Reparatur erklärt werden kann. Die gesamte Energiedosis im Blut lag im Mittel bei (109 ± 28) mGy. Der linear dosisabhängige Anstieg der RIF zu Therapiebeginn gleicht der dosisabhängigen Induktion der RIF *ex vivo* nach Bestrahlung mit β - und γ -emittierenden Radionukliden und kann gut mit der entsprechenden *Ex-vivo*-Kalibrierkurve beschrieben werden. Zu späteren Zeitpunkten (48 h und 96 h nach Verabreichung) konnte in dieser Arbeit eine lineare Korrelation zwischen der Anzahl der noch verbleibenden RIF und der Dosisleistung nachgewiesen werden. Eine signifikante Korrelation der Anzahl der RIF 96 h nach Verabreichung mit dem PSA-Wert deutet zudem darauf hin, dass ein Zusammenhang mit klinischen Parametern besteht.

Ein signifikanter Anstieg der γ -H2AX+53BP1-Foci konnte auch nach Verabreichung von [^{68}Ga]Ga-PSMA I&T für diagnostische PET/CT-Untersuchungen beobachtet werden, obwohl die Energiedosen im Blut bis zum PET/CT-Scan nur < 3 mGy betragen. Im Vergleich zur *Ex-vivo*-Kalibrierkurve war die Steigung der linearen Anpassungskurve *in vivo* im Bereich < 3 mGy in dieser Studie etwa um ein Zehnfaches höher, was auf eine mögliche Hypersensitivität im Niedrigdosisbereich hindeuten könnte. Der Beitrag der CT zur Energiedosis im Blut konnte durch *Ex-vivo*-Experimente auf etwa 12 mGy abgeschätzt werden.

Auch während Therapie mit [^{223}Ra]RaCl₂ lagen die berechneten Energiedosen im Blut im Niedrigdosisbereich < 17 mGy. Trotzdem konnten in dieser Studie erstmalig α -Spuren *in vivo* nach der Verabreichung eines α -emittierenden Radionuklids quantifiziert werden, deren Anzahl 3 h und 4 h nach Verabreichung des Radiopharmakons signifikant erhöht war. Auch zu späten Zeitpunkten, bis vier Wochen nach Therapiebeginn, waren noch α -Spuren nachweisbar, was auf eine unvollständige Reparatur der komplexen, durch die α -Teilchen induzierten DNA-Schäden hinweisen könnte. Leider erlaubte die geringe Anzahl an Patienten und Datenpunkten keine zuverlässigen Korrelationen mit der Energiedosis oder mit klinischen Parametern.

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass DNA-Schäden nach interner Bestrahlung mit α -, β - und γ -emittierenden Radionukliden mit Hilfe des γ -H2AX+53BP1-Assays zuverlässig nachgewiesen und anhand der Schadensgeometrie unterschieden werden können, wäre es in Zukunft interessant, DNA-Schäden auch nach Bestrahlung mit Radionuklidgemischen zu untersuchen. Dies könnte sowohl im Hinblick auf den Nachweis von Inkorporationen bei Strahlenunfällen hilfreich sein als auch zu einem besseren Verständnis der Effekte bei Behandlungen mit Radionuklidgemischen beitragen, welche vielversprechende Möglichkeiten für nuklearmedizinische Therapien bieten.

Zudem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass insbesondere im für die Diagnostik relevanten Bereich sehr niedriger Energiedosen < 10 mGy weiterer Forschungsbedarf besteht. Durch die Untersuchung der dosisabhängigen Reparatur der durch interne Bestrahlung induzierten DNA-Schäden könnte beispielsweise analysiert werden, ob die Reparaturfähigkeit im Niedrigdosisbereich eingeschränkt ist. Außerdem wäre es gerade im Bereich niedriger Dosen von Interesse, zu untersuchen, inwiefern Beobachtungen *ex vivo* das Verhalten *in vivo* geeignet repräsentieren. Um die erhöhten statistischen Unsicherheiten im Niedrigdosisbereich zu reduzieren, könnten zukünftig Verbesserungen auf dem Gebiet der automatisierten Auswertung der γ -H2AX+53BP1 enthaltenden Foci und Spuren hilfreich sein.

Weitere Ziele zukünftiger Forschungsvorhaben könnten gezielte Untersuchungen zu Korrelationen zwischen der dosisabhängigen Induktion und Reparatur von DNA-Schäden und klinischen Parametern sowie die Analyse von DNA-Schäden während mehrerer Therapiezyklen darstellen. In Zusammenhang mit der Analyse klinischer Parameter wäre es denkbar, dass biodosimetrische Auswertungen zukünftig auch zur personalisierten Therapieplanung oder auch zur Vorhersage des Therapieerfolgs dienen und somit langfristig zu einer Optimierung nuklearmedizinischer Therapien beitragen könnten.

8 Summary

In nuclear medicine, radioactive substances are applied for therapeutic purposes to destroy malignant tissue, or in diagnostic applications to visualize metabolic processes. However, the ionizing radiation of the applied radionuclides can also cause DNA damage in healthy cells. Among these, DNA double-strand breaks belong to the most critical lesions because they are difficult to repair and misrepair can lead to mutations or cell death. Therefore, during radionuclide therapies, it is of great importance to ensure that the deposited energy per mass, the absorbed dose, does not exceed certain values in organs at risk. One of these organs at risk is the hematopoietic system. As the absorbed dose to the bone marrow is often estimated by determining the absorbed dose to the blood as a surrogate, knowledge of the latter is of particular interest.

Therefore, in this thesis, calculations of the absorbed dose to the blood after internal irradiation were performed and the results were correlated with the number of radiation-induced DNA double-strand breaks in PBMCs. To quantify DNA damage, the biomarkers γ -H2AX and 53BP1 were used, which accumulate around a double-strand break after its formation and which can be visualized and quantified as microscopic foci by immunofluorescence staining. Consequently, the γ -H2AX+53BP1 assay allows a quantitative detection of radiation-induced double-strand breaks. Thus, by combining absorbed dose calculations with a quantitative analysis of DNA damage in PBMCs during internal irradiation with various radionuclides both *ex vivo* and *in vivo*, new knowledge was gained in the context of this work.

Ex-vivo examinations have the advantage that they can be carried out under constant, well-defined conditions and thus allow an analysis of the induction of double-strand breaks at preset absorbed doses and a constant irradiation duration. In this work, blood samples from healthy test persons were internally irradiated for one hour by adding radionuclides at defined activity concentrations. For the irradiation, the α -emitters ^{223}Ra and ^{224}Ra , the β^- -emitters ^{177}Lu and ^{90}Y , the β^+ -emitter ^{68}Ga and the γ -emitter ^{99m}Tc were used. The absorbed dose ranged from 5 mGy to 136 mGy.

After irradiating blood samples with β^- and γ -emitters, it was observed that the number of radiation-induced γ -H2AX+53BP1 foci (RIF) in the PBMCs increases linearly with the absorbed dose to the blood. Furthermore, it was shown that the induction of RIF is independent of the radionuclide applied and the test person.

After irradiating blood samples with α -emitters, in addition to the small round foci observed after exposure to β^- and γ -emitters, γ -H2AX+53BP1 containing tracks (α -tracks) were visible in the nuclei, which represented the trajectories of the emitted α -particles. It was shown that the number of these α -tracks increases linearly with the absorbed dose to the blood and is, therefore, a suitable parameter for biodosimetry after exposure to α -emitting radionuclides.

The absorbed dose dependence of DNA double-strand breaks during internal irradiation with radionuclides with different emission properties was also investigated *in vivo*. Due to the promising

new developments of radiopharmaceuticals for therapy and diagnostics of prostate cancer in recent years, blood samples from prostate cancer patients were examined during therapy with [^{177}Lu]Lu-PSMA I&T, during PET/CT diagnostics with [^{68}Ga]Ga-PSMA I&T and during therapy with [^{223}Ra]RaCl₂.

During therapy with [^{177}Lu]Lu-PSMA I&T, it was shown that the number of RIF in the first hours after therapy start can be approximated by a linear fitting curve, which increases with the absorbed dose to the blood, followed by a decrease in RIF at later time points, which can be explained by DNA repair. The total absorbed dose to the blood was (109 ± 28) mGy on average. The linear absorbed dose-dependent increase in RIF at the beginning of therapy is similar to the absorbed dose-dependent induction of RIF *ex vivo* after irradiation with β - and γ -emitting radionuclides and can be well described with the corresponding *ex-vivo* calibration curve. At later time points (48 h and 96 h after administration), a linear correlation between the number of remaining RIF and the dose rate was demonstrated in this work. A significant correlation of the number of RIF 96 h after administration with PSA levels also suggests a link to clinical parameters.

A significant increase in γ -H2AX+53BP1 foci was also observed after administration of [^{68}Ga]Ga-PSMA I&T for diagnostic PET/CT examinations, despite the fact that absorbed doses to the blood were only < 3 mGy by the time of the PET/CT scan. Compared to the *ex-vivo* calibration curve, the slope of the linear *in-vivo* fitting curve in the range < 3 mGy in this study was approximately ten times higher, which may indicate a possible hypersensitivity in the low dose range. The contribution of the CT to the absorbed dose to the blood was estimated at approximately 12 mGy by *ex-vivo* experiments.

During therapy with [^{223}Ra]RaCl₂, the calculated absorbed doses to the blood were also in the low dose range < 17 mGy. Nevertheless, this study was the first to quantify α -tracks *in vivo* after the administration of an α -emitting radionuclide, with a significantly increased number of α -tracks 3 h and 4 h after administration of the radiopharmaceutical. Even at late time points, up to four weeks after therapy start, α -tracks were still detectable, which could indicate incomplete repair of the complex DNA damage induced by α -particles. Unfortunately, the small number of patients and data points did not allow reliable correlations with the absorbed dose or clinical parameters. In this thesis, it was shown that DNA damage after internal irradiation with α -, β - and γ -emitting radionuclides can be reliably detected by applying the γ -H2AX+53BP1 assay and distinguished by damage geometry. For future work, it would be of interest to additionally investigate DNA damage after irradiation with mixtures of radionuclides. This could be helpful for the detection of incorporations after radiation accidents, and could also contribute to a better understanding of the effects of therapeutic applications of radionuclide mixtures, which offer promising opportunities for nuclear medicine therapies.

Furthermore, the results of this work show that there is need for further research, especially in the very low dose range < 10 mGy, which is relevant for diagnostics. By investigating the absorbed dose-dependent repair of DNA damage induced by internal irradiation, for example, it could be analyzed whether the repair capability is limited in the low dose range. Particularly in the range of low doses, it would also be of interest to investigate to what extent observations *ex vivo* adequately represent the behavior *in vivo*. In order to reduce the increased statistical uncertainties in the low dose range, future improvements in the field of automated evaluation of γ -H2AX+53BP1 containing foci and tracks could be helpful.

Further objectives of future research projects could be investigations focussing on correlations between the absorbed dose-dependent induction and repair of DNA damage and clinical parameters as well as an analysis of DNA damage over several therapy cycles. In the context of the analysis of clinical parameters, it is conceivable that biodosimetric assessments could enhance personalized treatment planning or the prediction of therapy success, thus contributing, in the long-term, to an optimization of nuclear medicine therapies.

9 Literaturverzeichnis

1. Lassmann, M und Nosske, D. Dosimetry of ^{223}Ra -chloride: dose to normal organs and tissues. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013;40:207–12.
2. Ghosh, A und Heston, WD. Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. *J Cell Biochem* 2004;91:528–39.
3. Sweat, SD, Pacelli, A, Murphy, GP und Bostwick, DG. Prostate-specific membrane antigen expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Urology* 1998;52:637–40.
4. Lassmann, M, Hänscheid, H, Chiesa, C et al. EANM Dosimetry Committee series on standard operational procedures for pre-therapeutic dosimetry I: blood and bone marrow dosimetry in differentiated thyroid cancer therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008;35:1405–12.
5. Lassmann, M, Hänscheid, H, Gassen, D et al. In vivo formation of gamma-H2AX and 53BP1 DNA repair foci in blood cells after radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *J Nucl Med* 2010;51:1318–25.
6. Rogakou, EP, Pilch, DR, Orr, AH, Ivanova, VS und Bonner, WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998;273:5858–68.
7. Schultz, LB, Chehab, NH, Malikzay, A und Halazonetis, TD. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 2000;151:1381–90.
8. Rothkamm, K, Barnard, S, Moquet, J, Ellender, M, Rana, Z und Burdak-Rothkamm, S. DNA damage foci: Meaning and significance. *Environ Mol Mutagen* 2015;56:491–504.
9. Eberlein, U, Peper, M, Fernández, M, Lassmann, M und Scherthan, H. Calibration of the gamma-H2AX DNA double strand break focus assay for internal radiation exposure of blood lymphocytes. *PLoS One* 2015;10:e0123174.
10. Eberlein, U, Nowak, C, Bluemel, C et al. DNA damage in blood lymphocytes in patients after ^{177}Lu peptide receptor radionuclide therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2015;42:1739–49.
11. Eberlein, U, Scherthan, H, Bluemel, C et al. DNA Damage in Peripheral Blood Lymphocytes of Thyroid Cancer Patients After Radioiodine Therapy. *J Nucl Med* 2016;57:173–9.
12. Krieger, H. Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes. Bd. 4. Auflage. Springer Spektrum, Vieweg+Teubner Verlag, 2012. DOI: 10.1007/978-3-8348-2238-3.
13. Sgouros, G, Hobbs, R und Josefsson, A. Dosimetry and Radiobiology of Alpha-Particle Emitting Radionuclides. *Curr Radiopharm* 2018;11:209–214.

14. Podgorsak, EB. Radiation Physics for Medical Physicists; 2nd ed. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. DOI: 10.1007/978-3-642-00875-7.
15. Eberlein, U. Zusammenhang zwischen physikalischer Dosimetrie und DNA Doppelstrangbrüchen in Lymphozyten nach Radionuklidtherapie. Thesis. 2015.
16. Bé, MM, Chisté, V, Dulieu, C et al. Table of Radionuclides. Bd. 6. Monographie BIPM-5. Pavillon de Breteuil, F-92310 Sèvres, France: Bureau International des Poids et Mesures, 2011.
17. Bé, MM, Chisté, V, Dulieu, C et al. Table of Radionuclides. Bd. 2. Monographie BIPM-5. Pavillon de Breteuil, F-92310 Sèvres, France: Bureau International des Poids et Mesures, 2004.
18. Bé, MM, Chisté, V, Dulieu, C et al. Table of Radionuclides. Bd. 3. Monographie BIPM-5. Pavillon de Breteuil, F-92310 Sèvres, France: Bureau International des Poids et Mesures, 2006.
19. Bé, MM, Chisté, V, Dulieu, C et al. Table of Radionuclides. Bd. 7. Monographie BIPM-5. Pavillon de Breteuil, F-92310 Sèvres, France: Bureau International des Poids et Mesures, 2013.
20. Bé, MM, Chisté, V, Dulieu, C et al. Table of Radionuclides. Bd. 1. Monographie BIPM-5. Pavillon de Breteuil, F-92310 Sèvres, France: Bureau International des Poids et Mesures, 2004.
21. Parker, C, Nilsson, S, Heinrich, D et al. Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2013;369:213–23.
22. Hoskin, P, Sartor, O, O’Sullivan, JM et al. Efficacy and safety of radium-223 dichloride in patients with castration-resistant prostate cancer and symptomatic bone metastases, with or without previous docetaxel use: a prespecified subgroup analysis from the randomised, double-blind, phase 3 ALSYMPCA trial. *Lancet Oncol* 2014;15:1397–406.
23. Nekolla, EA, Kellerer, AM, Kuse-Isingschulte, M, Eder, E und Spiess, H. Malignancies in patients treated with high doses of radium-224. *Radiat Res* 1999;152:S3–7.
24. Wick, RR, Atkinson, MJ und Nekolla, EA. Incidence of leukaemia and other malignant diseases following injections of the short-lived alpha-emitter ^{224}Ra into man. *Radiat Environ Biophys* 2009;48:287–94.
25. Westrom, S, Bonsdorff, TB, Bruland, OS und Larsen, RH. Therapeutic Effect of alpha-Emitting ^{224}Ra -Labeled Calcium Carbonate Microparticles in Mice with Intraperitoneal Ovarian Cancer. *Transl Oncol* 2018;11:259–267.
26. Westrom, S, Malenge, M, Jorstad, IS et al. Ra-224 labeling of calcium carbonate microparticles for internal alpha-therapy: Preparation, stability, and biodistribution in mice. *J Labelled Comp Radiopharm* 2018;61:472–486.
27. Juzeniene, A, Bernoulli, J, Suominen, M, Halleen, J und Larsen, RH. Antitumor Activity of Novel Bone-seeking, alpha-emitting ^{224}Ra -solution in a Breast Cancer Skeletal Metastases Model. *Anticancer Res* 2018;38:1947–1955.

-
28. Schumann, S, Eberlein, U, Muhtadi, R, Lassmann, M und Scherthan, H. DNA damage in leukocytes after internal ex-vivo irradiation of blood with the alpha-emitter Ra-223. *Sci Rep* 2018;8:2286.
 29. Eckerman, KF und Endo, A. *MIRD: Radionuclide Data and Decay Schemes*. Bd. 2nd Edition. Reston, VA: Society of Nuclear Medicine, 2008:VIII, 671 p.
 30. Schumann, S, Eberlein, U, Müller, J, Scherthan, H und Lassmann, M. Correlation of the absorbed dose to the blood and DNA damage in leukocytes after internal ex-vivo irradiation of blood samples with Ra-224. *EJNMMI Res* 2018;8:77.
 31. Bé, MM, Chisté, V, Dulieu, C et al. *Table of Radionuclides*. Bd. 5. Monographie BIPM-5. Pavillon de Breteuil, F-92310 Sèvres, France: Bureau International des Poids et Mesures, 2010.
 32. *Fundamental Quantities and Units for Ionizing Radiation (Revised)*. Report. The International Commission on Radiation Units and Measurements, 2011. DOI: doi:10.1093/jicru/nd.
 33. Loevinger, R und Berman, M. A schema for absorbed-dose calculations for biologically-distributed radionuclides. *J Nucl Med* 1968;Suppl 1:9–14.
 34. Loevinger, R und Berman, M. A formalism for calculation of absorbed dose from radionuclides. *Phys Med Biol* 1968;13:205–17.
 35. Stabin, MG, Sparks, RB und Crowe, E. OLINDA/EXM: the second-generation personal computer software for internal dose assessment in nuclear medicine. *J Nucl Med* 2005;46:1023–7.
 36. International Atomic Energy Agency (IAEA). *Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies*. 2011.
 37. Pernot, E, Hall, J, Baatout, S et al. Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. *Mutat Res* 2012;751:258–86.
 38. Schumann, S, Lassmann, M und Eberlein, U. Biodosimetry in nuclear medicine. *Der Nuklearmediziner* 2018;41:95–101.
 39. Rothkamm, K und Löbrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5057–62.
 40. Beels, L, Werbrouck, J und Thierens, H. Dose response and repair kinetics of gamma-H2AX foci induced by in vitro irradiation of whole blood and T-lymphocytes with X- and gamma-radiation. *Int J Radiat Biol* 2010;86:760–8.
 41. Grudzenski, S, Raths, A, Conrad, S, Rube, CE und Löbrich, M. Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:14205–10.
 42. Schipler, A und Iliakis, G. DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic Acids Res* 2013;41:7589–605.
 43. Herrmann, T, Baumann, M und Dörr, W. *Klinische Strahlenbiologie: kurz und bündig*. Elsevier, Urban und Fischer, 2006.

44. Rogakou, EP, Boon, C, Redon, C und Bonner, WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 1999;146:905–16.
45. Scherthan, H, Hieber, L, Braselmann, H, Meineke, V und Zitzelsberger, H. Accumulation of DSBs in gamma-H2AX domains fuel chromosomal aberrations. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;371:694–7.
46. Costes, SV, Chiolo, I, Pluth, JM, Barcellos-Hoff, MH und Jakob, B. Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutat Res* 2010;704:78–87.
47. Ainsbury, EA, Bakhanova, E, Barquinero, JF et al. Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures. *Radiat Prot Dosimetry* 2011;147:573–92.
48. Chowdhury, D, Keogh, MC, Ishii, H, Peterson, CL, Buratowski, S und Lieberman, J. gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 2005;20:801–9.
49. Löbrich, M, Shibata, A, Beucher, A et al. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 2010;9:662–9.
50. Horn, S, Barnard, S und Rothkamm, K. Gamma-H2AX-based dose estimation for whole and partial body radiation exposure. *PLoS One* 2011;6:e25113.
51. Mariotti, LG, Pirovano, G, Savage, KI et al. Use of the gamma-H2AX assay to investigate DNA repair dynamics following multiple radiation exposures. *PLoS One* 2013;8:e79541.
52. Iliakis, G, Wang, H, Perrault, AR et al. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res* 2004;104:14–20.
53. Ward, IM, Minn, K, Jorda, KG und Chen, J. Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J Biol Chem* 2003;278:19579–82.
54. Jakob, B, Scholz, M und Taucher-Scholz, G. Biological imaging of heavy charged-particle tracks. *Radiat Res* 2003;159:676–84.
55. Aten, JA, Stap, J, Krawczyk, PM et al. Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* 2004;303:92–5.
56. Hänscheid, H, Fernández, M, Eberlein, U und Lassmann, M. Self-irradiation of the blood from selected nuclides in nuclear medicine. *Phys Med Biol* 2014;59:1515–31.
57. Redon, CE, Dickey, JS, Bonner, WM und Sedelnikova, OA. gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Adv Space Res* 2009;43:1171–1178.
58. Roch-Lefevre, S, Mandina, T, Voisin, P et al. Quantification of gamma-H2AX foci in human lymphocytes: a method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure. *Radiat Res* 2010;174:185–94.
59. Golfier, S, Jost, G, Pietsch, H et al. Dicentric chromosomes and gamma-H2AX foci formation in lymphocytes of human blood samples exposed to a CT scanner: a direct comparison of dose response relationships. *Radiat Prot Dosimetry* 2009;134:55–61.

-
60. Schmeiser, HH, Muehlbauer, KR, Mier, W et al. DNA damage in human whole blood caused by radiopharmaceuticals evaluated by the comet assay. *Mutagenesis* 2019;34:239–244.
 61. Ding, D, Zhang, Y, Wang, J et al. gamma-H2AX/53BP1/pKAP-1 foci and their linear tracks induced by in vitro exposure to radon and its progeny in human peripheral blood lymphocytes. *Sci Rep* 2016;6:38295.
 62. Panier, S und Boulton, SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:7–18.
 63. Wang, J, He, L, Fan, D et al. Establishment of a gamma-H2AX foci-based assay to determine biological dose of radon to red bone marrow in rats. *Sci Rep* 2016;6:30018.
 64. Scherthan, H, Lee, JH, Maus, E et al. Nanostructure of Clustered DNA Damage in Leukocytes after In-Solution Irradiation with the Alpha Emitter Ra-223. *Cancers (Basel)* 2019;11.
 65. Sollazzo, A, Brzozowska, B, Cheng, L et al. Alpha Particles and X Rays Interact in Inducing DNA Damage in U2OS Cells. *Radiat Res* 2017;188:400–411.
 66. Haberkorn, U, Giesel, F, Morgenstern, A und Kratochwil, C. The Future of Radioligand Therapy: alpha, beta, or Both? *J Nucl Med* 2017;58:1017–1018.
 67. Ahmadzadehfar, H, Rahbar, K, Kürpig, S et al. Early side effects and first results of radioligand therapy with ¹⁷⁷Lu-DKFZ-617 PSMA of castrate-resistant metastatic prostate cancer: a two-centre study. *EJNMMI Res* 2015;5:114.
 68. Rahbar, K, Ahmadzadehfar, H, Kratochwil, C et al. German Multicenter Study Investigating ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. *J Nucl Med* 2017;58:85–90.
 69. Hofman, MS, Violet, J, Hicks, RJ et al. [¹⁷⁷Lu]-PSMA-617 radionuclide treatment in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (LuPSMA trial): a single-centre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2018;19:825–833.
 70. Kratochwil, C, Giesel, FL, Stefanova, M et al. PSMA-Targeted Radionuclide Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with ¹⁷⁷Lu-Labeled PSMA-617. *J Nucl Med* 2016;57:1170–6.
 71. Baum, RP, Kulkarni, HR, Schuchardt, C et al. ¹⁷⁷Lu-Labeled Prostate-Specific Membrane Antigen Radioligand Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Safety and Efficacy. *J Nucl Med* 2016;57:1006–13.
 72. Kulkarni, HR, Singh, A, Schuchardt, C et al. PSMA-Based Radioligand Therapy for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: The Bad Berka Experience Since 2013. *J Nucl Med* 2016;57:97S–104S.
 73. Schumann, S, Scherthan, H, Lapa, C et al. DNA damage in blood leucocytes of prostate cancer patients during therapy with ¹⁷⁷Lu-PSMA. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2019.
 74. Eisenhauer, EA, Therasse, P, Bogaerts, J et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45:228–47.
 75. Wahl, RL, Jacene, H, Kasamon, Y und Lodge, MA. From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. *J Nucl Med* 2009;50 Suppl 1:122S–50S.

76. Scher, HI, Morris, MJ, Stadler, WM et al. Trial Design and Objectives for Castration-Resistant Prostate Cancer: Updated Recommendations From the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group 3. *J Clin Oncol* 2016;34:1402–18.
77. Wilkins, RC, Wilkinson, D, Maharaj, HP, Bellier, PV, Cybulski, MB und McLean, JR. Differential apoptotic response to ionizing radiation in subpopulations of human white blood cells. *Mutat Res* 2002;513:27–36.
78. Horn, S, Barnard, S, Brady, D, Prise, KM und Rothkamm, K. Combined analysis of gamma-H2AX/53BP1 foci and caspase activation in lymphocyte subsets detects recent and more remote radiation exposures. *Radiat Res* 2013;180:603–9.
79. Lamkowski, A, Forcheron, F, Agay, D et al. DNA damage focus analysis in blood samples of minipigs reveals acute partial body irradiation. *PLoS One* 2014;9:e87458.
80. Doai, M, Watanabe, N, Takahashi, T et al. Sensitive immunodetection of radiotoxicity after iodine-131 therapy for thyroid cancer using gamma-H2AX foci of DNA damage in lymphocytes. *Ann Nucl Med* 2013;27:233–8.
81. Denoyer, D, Lobachevsky, P, Jackson, P, Thompson, M, Martin, OA und Hicks, RJ. Analysis of ¹⁷⁷-DOTA-octreotate therapy-induced DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with neuroendocrine tumors. *J Nucl Med* 2015;56:505–11.
82. May, MS, Brand, M, Wuest, W et al. Induction and repair of DNA double-strand breaks in blood lymphocytes of patients undergoing ¹⁸F-FDG PET/CT examinations. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012;39:1712–9.
83. Schnarr, K, Carter, TF, Gillis, D et al. Biological Response of Positron Emission Tomography Scan Exposure and Adaptive Response in Humans. *Dose Response* 2015;13:1559325815611904.
84. Prasad, A, Visweswaran, S, Kanagaraj, K et al. ¹⁸F-FDG PET/CT scanning: Biological effects on patients: Entrance surface dose, DNA damage, and chromosome aberrations in lymphocytes. *Mutat Res* 2019;838:59–66.
85. Nautiyal, A, Mondal, T, Mukherjee, A et al. Quantification of DNA damage in patients undergoing non-contrast and contrast enhanced whole body PET/CT investigations using comet assay and micronucleus assay. *Int J Radiat Biol* 2019:1–9.
86. Brix, G, Günther, E, Rössler, U et al. Double-strand breaks in lymphocyte DNA of humans exposed to [¹⁸F]fluorodeoxyglucose and the static magnetic field in PET/MRI. *EJNMMI Res* 2020;10:43.
87. Schumann, S, Scherthan, H, Frank, T et al. DNA Damage in Blood Leukocytes of Prostate Cancer Patients Undergoing PET/CT Examinations with [⁶⁸Ga]Ga-PSMA I&T. *Cancers (Basel)* 2020;12.
88. Gebrauchsanweisung Ionisationskammern Typ 23322 und Typ 23323. PTW-Freiburg.
89. Beels, L, Bacher, K, De Wolf, D, Werbrouck, J und Thierens, H. gamma-H2AX foci as a biomarker for patient X-ray exposure in pediatric cardiac catheterization: are we underestimating radiation risks? *Circulation* 2009;120:1903–9.

-
90. Beels, L, Bacher, K, Smeets, P, Verstraete, K, Vral, A und Thierens, H. Dose-length product of scanners correlates with DNA damage in patients undergoing contrast CT. *Eur J Radiol* 2012;81:1495–9.
 91. Vandevoorde, C, Franck, C, Bacher, K et al. gamma-H2AX foci as in vivo effect biomarker in children emphasize the importance to minimize x-ray doses in paediatric CT imaging. *Eur Radiol* 2015;25:800–11.
 92. Waldren, CA. Classical radiation biology dogma, bystander effects and paradigm shifts. *Hum Exp Toxicol* 2004;23:95–100.
 93. Lengert, N, Mirsch, J, Weimer, RN et al. AutoFoci, an automated high-throughput foci detection approach for analyzing low-dose DNA double-strand break repair. *Sci Rep* 2018;8:17282.
 94. Harbron, R, Ainsbury, EA, Bouffler, SD, Tanner, RJ, Eakins, JS und Pearce, MS. Enhanced radiation dose and DNA damage associated with iodinated contrast media in diagnostic X-ray imaging. *Br J Radiol* 2017;90:20170028.
 95. Jost, G, Golfier, S, Pietsch, H et al. The influence of x-ray contrast agents in computed tomography on the induction of dicentric and gamma-H2AX foci in lymphocytes of human blood samples. *Phys Med Biol* 2009;54:6029–39.
 96. Grudzinski, S, Kuefner, MA, Heckmann, MB, Uder, M und Löbrich, M. Contrast medium-enhanced radiation damage caused by CT examinations. *Radiology* 2009;253:706–14.
 97. Pathe, C, Eble, K, Schmitz-Beuting, D et al. The presence of iodinated contrast agents amplifies DNA radiation damage in computed tomography. *Contrast Media Mol Imaging* 2011;6:507–13.
 98. Deinzer, CK, Danova, D, Kleb, B, Klose, KJ und Heverhagen, JT. Influence of different iodinated contrast media on the induction of DNA double-strand breaks after in vitro X-ray irradiation. *Contrast Media Mol Imaging* 2014;9:259–67.
 99. Gould, R, McFadden, SL, Horn, S, Prise, KM, Doyle, P und Hughes, CM. Assessment of DNA double-strand breaks induced by intravascular iodinated contrast media following in vitro irradiation and in vivo, during paediatric cardiac catheterization. *Contrast Media Mol Imaging* 2016;11:122–9.
 100. Piechowiak, EI, Peter, JF, Kleb, B, Klose, KJ und Heverhagen, JT. Intravenous Iodinated Contrast Agents Amplify DNA Radiation Damage at CT. *Radiology* 2015;275:692–7.
 101. Wang, L, Li, Q, Wang, XM et al. Enhanced radiation damage caused by iodinated contrast agents during CT examination. *Eur J Radiol* 2017;92:72–77.
 102. Harbron, RW, Ainsbury, EA, Bouffler, SD, Tanner, RJ, Pearce, MS und Eakins, JS. The impact of iodinated contrast media on intravascular and extravascular absorbed doses in X-ray imaging: A microdosimetric analysis. *Phys Med* 2018;46:140–147.
 103. Horn, S, Brady, D und Prise, K. Alpha particles induce pan-nuclear phosphorylation of H2AX in primary human lymphocytes mediated through ATM. *Biochim Biophys Acta* 2015;1853:2199–206.

104. Carrasquillo, JA, O'Donoghue, JA, Pandit-Taskar, N et al. Phase I pharmacokinetic and biodistribution study with escalating doses of ^{223}Ra -dichloride in men with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013;40:1384–93.
105. Bannik, K, Madas, B, Jarzombek, M et al. Radiobiological effects of the alpha emitter Ra-223 on tumor cells. *Sci Rep* 2019;9:18489.
106. Al Darwish, R, Staudacher, AH, Li, Y, Brown, MP und Bezak, E. Development of a transmission alpha particle dosimetry technique using A549 cells and a Ra-223 source for targeted alpha therapy. *Med Phys* 2016;43:6145.
107. Runge, R, Oehme, L, Grosche-Schlee, S, Braune, A, Freudenberg, R und Kotzerke, J. Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in the lymphocytes of prostate cancer patients after radium-223 treatment as assessed by the gammaH2AX foci assay. *Nuklearmedizin* 2019;58:387–394.
108. Nikitaki, Z, Nikolov, V, Mavragani, IV et al. Measurement of complex DNA damage induction and repair in human cellular systems after exposure to ionizing radiations of varying linear energy transfer (LET). *Free Radic Res* 2016;50:S64–S78.
109. Sage, E und Shikazono, N. Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis. *Free Radic Biol Med* 2017;107:125–135.
110. Bobkova, E, Depes, D, Lee, JH et al. Recruitment of 53BP1 Proteins for DNA Repair and Persistence of Repair Clusters Differ for Cell Types as Detected by Single Molecule Localization Microscopy. *Int J Mol Sci* 2018;19.
111. Rübe, CE, Lorat, Y, Schuler, N, Schanz, S, Wennemuth, G und Rübe, C. DNA repair in the context of chromatin: new molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy. *DNA Repair (Amst)* 2011;10:427–37.
112. Lorat, Y, Brunner, CU, Schanz, S, Jakob, B, Taucher-Scholz, G und Rübe, CE. Nanoscale analysis of clustered DNA damage after high-LET irradiation by quantitative electron microscopy—the heavy burden to repair. *DNA Repair (Amst)* 2015;28:93–106.
113. Stephan, G, Kampen, WU, Nosske, D und Roos, H. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of patients treated with radium-224 for ankylosing spondylitis. *Radiat Environ Biophys* 2005;44:23–8.

A Angaben zur Finanzierung und zur Einhaltung ethischer Standards

Diese Arbeit wurde in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Radiobiologie der Bundeswehr durchgeführt und im Rahmen des Projektes „Abgleich der physikalischen mit der biologischen DNA Dosimetrie nach Behandlung mit offenen radioaktiven Stoffen“ von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert (LA 2304/3-2 und SCHE 350/12-2).

Vor der Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Studien wurde das Studienprotokoll der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg vorgelegt. Diese hatte keine Einwände gegen die Durchführung der Studien (Az: 209/14 und 165/14). Alle Untersuchungen an Patienten und Versuchspersonen entsprachen den ethischen Standards der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg und den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki von 1964 und ihrer späteren Erweiterungen oder vergleichbaren ethischen Standards. Alle in die Studien eingeschlossenen Patienten und Versuchspersonen gaben nach der Aufklärung über die Studie ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme.

B Abkürzungen

CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTATATE	DOTA-D-Phe-Tyr ³ -octreotate
DOTATOC	DOTA-D-Phe-Tyr ³ -octreotide
FDG	Fluordesoxyglucose
GK	Ganzkörper
KM	Kontrastmittel
LET	Linearer Energietransfer
MAG3	Mercaptoacetyltriglycin
MIRD	Medical Internal Radiation Dose
mPERCIST	Modified Positron Emission Tomography Response Criteria in Solid Tumors
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Positronenemissionstomographie (engl. Positron Emission Tomography)
PBMC	Mononukleare Zelle des peripheren Blutes (engl. Peripheral Blood Mononuclear Cell)
PCWG3	Prostate Cancer Group 3
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RIF	Strahlungsinduzierte Foci (engl. Radiation-Induced Foci)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species)
RSO	Radiosynoviorthese
SD	Standardabweichung (engl. Standard Deviation)
SMLM	Single Molecule Localization Microscopy
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (engl. Single Photon Emission Computed Tomography)
TIAC	Time-Integrated Activity Coefficient

C Publikationsliste

Publikationen

- Schumann S, Scherthan H, Frank T, Lapa C, Müller J, Seifert S, et al. DNA Damage in Blood Leukocytes of Prostate Cancer Patients Undergoing PET/CT Examinations with [⁶⁸Ga]Ga-PSMA I&T. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2).
- Scherthan H, Lee JH, Maus E, Schumann S, Muhtadi R, Chojowski R, et al. Nanostructure of Clustered DNA Damage in Leukocytes after In-Solution Irradiation with the Alpha Emitter Ra-223. *Cancers (Basel)*. 2019;11(12).
- Schumann S, Scherthan H, Lapa C, Serfling S, Muhtadi R, Lassmann M, et al. DNA damage in blood leucocytes of prostate cancer patients during therapy with ¹⁷⁷Lu-PSMA. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2019;46(8):1723-32.
- Schumann S, Eberlein U, Müller J, Scherthan H, Lassmann M. Correlation of the absorbed dose to the blood and DNA damage in leukocytes after internal ex-vivo irradiation of blood samples with Ra-224. *EJNMMI Res*. 2018;8(1):77.
- Schumann S, Lassmann M, Eberlein U. Biodosimetry in nuclear medicine. *Der Nuklearmediziner*. 2018;41:95-101.
- Schumann S, Eberlein U, Muhtadi R, Lassmann M, Scherthan H. DNA damage in leukocytes after internal ex-vivo irradiation of blood with the alpha-emitter Ra-223. *Sci Rep*. 2018;8(1):2286.
- Fritsch V, Huang CL, Bagrets N, Grube K, Schumann S, Löhneysen HV. Magnetization and specific heat of CePd_{1-x}Ni_xAl. *Phys Status Solidi B*. 2013;250(3):506-10.

Konferenzbeiträge

- Schumann S, Scherthan H, Hartrampf PE, Buck AK, Port M, Lassmann M, et al. Differences of ex vivo and in vivo DSB induction and repair after internal irradiation in PBMCs during radioiodine therapy. EANM'20 Virtual; European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging; Online Congress 2020.
- Schumann S, Scherthan H, Hartrampf PE, Buck AK, Port M, Lassmann M, et al. Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Blutleukozyten nach Radioiodtherapie des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms – Vergleich zwischen In-vivo- und Ex-vivo-Bestrahlung. 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin; Nuklearmedizin – Molecular Imaging and Therapy; Online Congress 2020.

- Hahn J, Schumann S, Eberlein U, Müller J, Lassmann M, Scherthan H. Strahlungsinduzierte DNA-Doppelstrangbrüche und deren Reparatur in Leukozyten aus Probandenblut nach Ex-vivo-Bestrahlung mit Iod-131. 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin; Nuklearmedizin – Molecular Imaging and Therapy; Online Congress 2020.
- Schumann S, Lassmann M, Lapa C, Muhtadi R, Scherthan H, Eberlein U. Alpha Particles Induce DNA Damage in Leukocytes during Treatment with Ra-223. EANM'19; European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging; Barcelona 2019.
- Lee J-H, Bobkova E, Gier T, Gote M, Schmidt-Kaler F, Brieger E, et al. Mechanisms and Challenges for Understanding Radiation Induced Changes in Chromatin Nanoarchitecture and Repair Complex Formation. 22nd Annual Meeting of the Society for Biological Radiation Research; Deutsche Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (deGBS); Mannheim 2019.
- Schumann S, Eberlein U, Lapa C, Buck AK, Port M, Lassmann M, et al. Der DSB Focus Assay zum Nachweis einer inneren Strahlenexposition durch β - oder γ -Strahler. Fachverband für Strahlenschutz - Jahrestagung 2019 – Strahlenschutz und Medizin; Würzburg 2019.
- Schumann S, Scherthan H, Lapa C, Serfling S, Muhtadi R, Lassmann M, et al. Induction and repair of DNA double strand breaks in blood leukocytes of prostate cancer patients during Lu-177-PSMA therapy. SNMMI 2019 – Annual Meeting; Journal of Nuclear Medicine; Anaheim, California 2019.
- Schumann S, Scherthan H, Lapa C, Lassmann M, Eberlein U. Are there differences in the DNA double -strand break induction in blood leukocytes of prostate cancer patients during Ga-68-PSMA diagnostics and Lu-177-PSMA therapy? SNMMI 2019 – Annual Meeting; Journal of Nuclear Medicine; Anaheim, California 2019.
- Lee J-H, Maus E, Brieger E, Muhtadi R, Wagner E, Bobkova E, et al. Mechanisms and Challenges for Understanding Radiation Induced Changes in Chromatin Nanoarchitecture and Repair Complex Formation. ConRad 2019 – Global Conference on Radiation Topics; Munich 2019.
- Schumann S, Scherthan H, Frank T, Lapa C, Bluemel C, Müller J, et al. DNA-Schäden in Leukozyten von Patienten nach PET/CT-Untersuchungen mit Ga-68-PSMA. 57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin; Nuklearmedizin – Molecular Imaging and Therapy; Bremen 2019.
- Lee J-H, Bobkova E, Gier T, Gote M, Schmidt-Kaler F, Brieger E, et al. Mechanisms and challenges for understanding radiation induced changes in chromatin nanoarchitecture. Dny radiacni ochrany – DRO 2018; Mikulov, Czech Republic 2018.
- Schumann S, Eberlein U, Müller J, Lassmann M, Scherthan H. Absorbed dose-dependent DNA damage in leukocytes after internal irradiation of blood with Ra-224 compared to Ra-223. EANM'18; European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging; Düsseldorf 2018.
- Schumann S, Eberlein U, Müller J, Lassmann M, Scherthan H. Radionuclide-induced DNA damage in leukocytes after in-solution irradiation of blood with α -, β - and γ -emitters used in nuclear medicine. 21st Annual Meeting of the Society for Biological Radiation Research; Deutsche Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (deGBS); Frankfurt 2018.

-
- Hausmann M, Lee J-H, Maus E, Wagner E, Krufczik M, Chojowski R, et al. Nano-Probes and Super-Resolution Localization Microscopy: A Pointilist View on DNA-Repair and Biological Dosimetry in 3D-Conserved Cell Nuclei. 21st Annual Meeting of the Society for Biological Radiation Research; Deutsche Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (deGBS); Frankfurt 2018.
 - Schumann S, Eberlein U, Müller J, Lassmann M, Scherthan H. Dose-dependent DNA damage after ex-vivo irradiation of blood with radionuclides frequently used in Nuclear Medicine. EPR Biodose 2018; Munich 2018.
 - Schumann S, Scherthan H, Müller J, Lassmann M, Eberlein U. DNA damage in leukocytes after internal ex-vivo irradiation of blood with radionuclides frequently used in Nuclear Medicine. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering (IUPESM 2018); Prague 2018.
 - Schumann S, Scherthan H, Lapa C, Bluemel C, Müller J, Buck AK, et al. DNA damage in blood leukocytes after internal irradiation with Ga-68 – in-vivo and in-vitro studies. EANM'17; European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging; Vienna 2017.
 - Schumann S, Eberlein U, Muhtadi R, Lassmann M, Scherthan H. DNA damage in blood leukocytes after internal in-vitro irradiation of blood with the alpha-emitter Ra-223. EANM'17; European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging; Vienna 2017.
 - Scherthan H, Schumann S, Eberlein U, Lassmann M. DNA damage response to internal low dose irradiation by beta and alpha emitters. Global Conference on Radiation Topics – Preparedness, Response, Protection and Research; Munich 2017.
 - Schumann S, Scherthan H, Müller J, Lassmann M, Eberlein U. In-vitro calibration of the DNA DSB focus assay for internal irradiation of blood lymphocytes with the β^+ -emitter Ga-68. 19th Annual Meeting of the Society for Biological Radiation Research; Deutsche Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (deGBS); Erlangen 2016.

D Lebenslauf

E Eidesstattliche Erklärung (Affidavit)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Zeit- und Dosisabhängigkeit von DNA-Schäden induziert durch interne Bestrahlung mit unterschiedlichen Radionukliden“ eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 30. September 2020

Sarah Schumann

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Time and dose dependence of DNA damage induced by internal irradiation with various radionuclides“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, 30. September 2020

Sarah Schumann

F Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Laßmann bedanken, der dieses spannende Thema bereit gestellt und sich immer Zeit für Fragen und Diskussionen genommen hat. Vielen Dank für die exzellente Betreuung und anhaltende Unterstützung vom ersten Tag bis zur Abgabe dieser Arbeit.
- Ein ganz herzlicher Dank gilt Dr. Uta Eberlein, die mir all das „Handwerk“ für diese Arbeit beigebracht hat, mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und als tolle Kollegin auch schnell zu einer sehr guten Freundin wurde.
- Für die hervorragende Kooperation danke ich Prof. Dr. Harry Scherthan, der durch die schnelle und zuverlässige Auswertung der Foci und Spuren und durch sein biologisches Fachwissen wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen hat. Ohne diese einzigartige fächerübergreifende Zusammenarbeit wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke an dieser Stelle auch an das Team des Instituts für Radiobiologie der Bundeswehr, das ihn dabei unterstützt hat.
- Frau Prof. Dr. Tcholon Djuzenova und Prof. Dr. Andreas Buck danke ich dafür, dass sie direkt bereit waren, die Betreuung dieser Arbeit als Teil meines Promotionskomitees zu übernehmen und mich während der gesamten Zeit unterstützt haben.
- Prof. Dr. Peter Jakob danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.
- Beim gesamten Team der Nuklearmedizin möchte ich mich für die großartige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bedanken. Diese Arbeit konnte nur durch eine gute interdisziplinäre Zusammenarbeit gelingen. Daher gilt mein herzlicher Dank allen, die durch die Aufklärung der Patienten und Versuchspersonen, die Abnahmen der Blutproben, die Durchführung der Messungen und Aufnahmen, die Bereitstellung von Radiopharmaka und Reagenzien, die Unterstützung im Labor sowie bei technischen Problemen und durch vieles Weitere dazu beigetragen haben.
- Ein besonderer Dank gilt dem Team der Medizinphysik für das tolle Arbeitsklima. Danke insbesondere an Dr. Seval Beykan, Dr. Jéssica Soares Machado, Julius Neba, Dr. Maikol Salas Ramírez und Dr. Johannes Tran-Gia für die spaßige Zeit während Mittagspausen, Kongressen und allen sonstigen Unternehmungen.
- Allen Patienten und Versuchspersonen danke ich für ihre Bereitschaft, an den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien teilzunehmen.
- Bei meinem Bruder Manuel, Prof. Dr. Harry Scherthan und Dr. Johannes Tran-Gia möchte ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die hilfreichen Änderungsvorschläge bedanken.

- Der Graduate School of Life Sciences (GSLs) der Universität Würzburg danke ich, dass ich im Rahmen des strukturierten Promotionsprogramms von dem vielfältigen Angebot an Kursen und Veranstaltungen profitieren konnte und meine Teilnahme an mehreren Kongressen durch Reisestipendien finanziell unterstützt wurde.
- Für die Förderung des Projektes „Abgleich der physikalischen mit der biologischen DNA Dosimetrie nach Behandlung mit offenen radioaktiven Stoffen“, in dessen Rahmen diese Arbeit durchgeführt wurde, danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft.
- Zum Schluss möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern Katharina und Josef und bei meinem Mann Torsten, sowie bei allen Freunden bedanken, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben.