

Jan-Hinnerk Mehrkens  
Dr. med

## **Klonogene Radiosensitivität, Ploidie und Zellzyklusverteilung humaner maligner Gliome in Primärkultur**

Geboren am 27. 10. 1971 in Wolfsburg  
Reifeprüfung am 11. 06. 1991 in Ulm  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1992 bis WS 1998  
Physikum am 24. 03. 1994 an der Universität Würzburg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Houston (USA), San Antonio (USA) und Heidelberg  
Staatsexamen am 12. 11. 1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Radiologie  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. K.-J. Weber

Die Entwicklung experimenteller Verfahren für eine Vorhersage der *in vivo* Strahlenreaktion (prädiktive Assays) ist gegenwärtig ein zentrales Motiv strahlenbiologischer Forschung.

Der generelle Zusammenhang zwischen dem Ansprechen von Tumoren unterschiedlicher Herkunft / Histologie unter Strahlentherapie und der klonogenen Strahlenempfindlichkeit von Zellen dieser Tumoren *in vitro* ist lange bekannt und begründet die Idee der intrinsische Strahlenempfindlichkeit als einer Determinante der geweblichen Strahlenantwort. Daneben sind andere Einflußgrößen bedeutend, die sich aus Besonderheiten des Zellverbandes ergeben. Das Konzept der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit beinhaltet die Annahme einer interindividuellen Variabilität dieses Parameters auch für Zellen von Geweben gleicher Histologie. Eine Testung prädiktiver Ansätze, insbesondere für das Ansprechen einer spezifischen Tumorentität, gilt daher als aussichtsreich, wenn verschiedene strahlenbiologisch relevante Einflußgrößen gemeinsam erfasst werden. Offensichtlich setzt diese Vorgehensweise voraus, daß ein Testverfahren, wie der klonogene Assay, hinreichend reproduzierbar durchgeführt werden kann, um solche interindividuellen Unterschiede zu diskriminieren.

Die geringe intrinsische Radiosensitivität von Zellen maligner Gliome, insbesondere des Glioblastoms, gilt als ein wichtiger Grund für die Resistenz dieser Tumoren gegenüber Strahlentherapie. Auf einer individuellen Basis fand sich allerdings keine direkte Korrelation und wurde als Ausdruck der Bedeutung anderer gewebespezifischer Parameter der

Strahlenwirkung gewertet. Diese im wesentlichen durch eine Arbeitsgruppe erhobenen bzw. mit anderen Autoren gemeinsam publizierten Daten zeigen allerdings die Problematik einer nur unzureichend nachvollziehbaren Überprüfung des tatsächlichen Nachweises einer interindividuellen Variabilität der klonogenen Strahlenempfindlichkeiten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die klonogene Strahlenempfindlichkeit für 10 verschiedene humane Gliome (2 WHO-Grad II, 1 WHO-Grad III, 7 WHO-Grad IV) in Primärkultur untersucht. In der 4. bis 6. Passage wurde das klonogene Überleben mittels des für die Primärkulturen optimierten Koloniebildungs-Assays bestimmt. Daneben wurden die Primärkulturen (Kontrolle, 5 Gy-bestrahlt) durchflußzytometrisch hinsichtlich Ploidie, Zellzyklusverteilung und Anzeichen für Apoptose charakterisiert. Der in dieser Form im Labor als Standard etablierte Assay liefert Überlebens-Kurven mit hoher Reproduzierbarkeit, so daß eine hoch signifikant kleinere intra - als interindividuelle Variabilität (CV von 6,4% zu 14,5 %) für den SF2-Wert nachgewiesen werden konnte. Bei einer insgesamt zwar recht engen Range der SF2-Werte der Primärkulturen (0,41-0,64) konnte so dennoch der eindeutige Nachweis unterschiedlicher intrinsischer Radioresistenzen erbracht werden. Unter den 10 Primärkulturen sind auch zwei Grad II (sowie ein Grad III) Gliome. Die Daten dieser Kulturen weichen jedoch kaum von denen der Grad IV Gliome (GBM) ab, wobei natürlich die Fallzahl für eine schlußendliche Aussage zu gering ist. Die Verteilung der gemessenen SF2-Werte entspricht insgesamt der in Literatur beschrieben, bekannten hohen Radioresistenz dieses Tumorzelltyps.

Als wichtiger Aspekt der Charakterisierung der Primärkulturen hinsichtlich Subpopulationen und Ploidie-Grade mittels der DAPI-Einparameter-Durchflußzytometrie zeigt sich ein klarer Trend (Wilcoxon Test nicht signifikant,  $p=0,09$ ) für eine Zunahme des Anteils der aneuploiden Zellen einer Kultur nach Bestrahlung im *nicht-klonogenen* Assay. Dies könnte als möglicher Ausdruck einer höheren Radioresistenz gesehen werden. Hierfür findet sich jedoch keine Entsprechung in erhöhter Klonogenität (SF2-Wert) der Kulturen mit hohem Anteil an aneuploiden Zellen (deutlich nicht signifikant im Student-t-Test). Daneben finden sich Unterschiede in den S-Phasenanteilen der Subpopulationen, wobei die aneuploiden Subpopulationen einen höheren Mittelwert und Median aufweisen. Die vorliegenden Unterschiede diesbezüglich sind jedoch nur relativ gering und statistisch nicht signifikant, was sehr wohl mit durch die geringe Fallzahl von  $n = 10$  bedingt sein kann. So liefert die Arbeit von Ehemann et al. (1999) mit untersuchten 95 Primärtumoren diesbezüglich Daten mit deutlicher Signifikanz.

Die im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse über die Untersuchung der intrinsischen Strahlenresistenz humaner Gliome in Primärkultur, vor allem mittels des optimierten klonogenen Assays als prädiktivem Test mit hoher Reproduzierbarkeit, stellen zusammenfassend einen wesentlichen Ausgangspunkt für weiterführende radiobiologische Untersuchungen mit diesem experimentellen System zusammen mit zusätzlichen Verfahren zu strahlenbiologischen Charakterisierung humaner Gliome dar.