

Gunnar Frank Christopher Böhrnsen
Dr. sc. hum.

Bestimmung der biologischen Wirksamkeit von hochenergetischen Kohlenstoffionen bei niedrigen Dosen mittels eines semi-automatischen Zell-Erkennungs-Systems

Geboren am 16.09.1970 in Hamburg
Reifeprüfung am 21.06.1990 in Hamburg
Studiengang der Fachrichtung Physik vom WS 1991 bis SS 1998
Vordiplom am 14.10.1993 an der Universität Hamburg
Diplom am 21.07.1998 an der Universität Hamburg

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

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Aufbau eines Systems zur automatischen Lokalisation von Zellen und deren Beobachtung zur detaillierten Bestimmung des Koloniewachstums nach Bestrahlung mit Photonen und Ionenstrahlen insbesondere im Niedrigdosis-Bereich.

Das erstellte System zur automatischen Zelllokalisierung und Identifikation erfüllte im wesentlichen die angestrebten Anforderungen. Zwar blieb es aufgrund der technischen Voraussetzungen ein wenig in der Geschwindigkeit hinter dem DMIPS-System von Palcic und Jaggi zurück, war aber mit einer Geschwindigkeit von ca. 15-20 Minuten pro Probe (ca. 250 Zellen/h) schnell genug, um die angestrebten Experimente durchführen zu können. Das Auswertesystem lieferte eine vollautomatische Erkennungsrate von etwa 90% der ausgesäten Zellen (vergleichbar zum DMIPS). Da der Anspruch bestand, in der Detektion eine 100%-ige Ausbeute der ausgesäten Zellen zu erzielen sowie die fälschlicherweise als Zellen identifizierten Objekte vollständig zu eliminieren, wurde eine interaktive Benutzerkontrolle der lokalisierten Objekte als Option im Programmablauf integriert, sodass die angestrebte Qualität gesichert war.

Die Relokalisation der Zellen bzw. Kolonien an den folgenden Tagen erfolgte, trotz teilweise erheblicher Zellwanderungen von einigen Zelldurchmessern pro Tag, problemlos. Die Zellzahl pro Kolonie wurde proportional zur Zellfläche berechnet, da sich eine Segmentation der eng zusammenwachsenden, ungefärbten Zellen nicht realisieren ließ. Die auf diese Weise berechneten Zellzahlen pro Kolonie standen in guter Übereinstimmung mit Zählungen der Benutzer, wobei die Abweichungen hierbei im Bereich $\pm 20\%$ lagen und durch die stark variierende Zelldichte innerhalb verschiedener Kolonien derselben Zellpopulation begründet waren. Dies war aber absolut ausreichend, um exponentielles Wachstum beobachten und klassifizieren zu können. Eine Woche lang wurden täglich jeweils die Koloniefächen ausgemessen und Aufnahmen der Kolonien gespeichert. Letztere dienten auch dem Benutzer zur Verifikation der automatisch gewonnenen Ergebnisse.

Aus Koloniegrößenmessungen wurden zunächst anhand des Standardkriteriums (mindestens 50 Zellen pro Kolonie für eine überlebende Zelle) Überlebenskurven generiert. Experimente mit 6 MV Photonen, Uranionen (5,8 MeV/u), Nickelionen (11,4 MeV/u) und Kohlenstoffionen (11,4 MeV/u und 100 MeV/u) bestätigten im Vergleich mit den Ergebnissen konventioneller Verdünnungs-Assays aus der Literatur die Funktionalität des Systems.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten boten darüber hinaus die Möglichkeit Wachstumsverzögerungen einzelner Kolonien sowie die Reduktion der mittleren Zellzahl überlebender Kolonien in Abhängigkeit von der Dosis zu dokumentieren. Speziell bei Dosen

von mehreren Gray bzw. dem Einsatz von Ionen mit hohem LET wurde dabei sehr deutlich, dass ein ausreichend langer Beobachtungszeitraum (in diesem Fall mindestens 5 Tage) vonnöten ist, um das Überlebenskriterium nach Puck und Marcus gewissenhaft anwenden zu können. Der direkte Vergleich zwischen Überlebensmessungen nach 3 und 6 Tagen zeigte bei dem frühen Zeitpunkt deutlich ein zu niedriges gemessenes Überleben bei höheren Dosen. Weiterhin war ersichtlich, dass die Effekte der Hypersensitivität zu früheren Zeiten stärker ausgeprägt sind.

Experimente zur Messung einer eventuellen Hypersensitivität in Niedrigdosisbereich wurden mit 6 MV Photonen und 100 MeV/u Kohlenstoffionen durchgeführt. Hierbei wurde besonderer Wert darauf gelegt, eine sehr sorgfältige und gewissenhafte Aufbereitung und

Normierung der Rohdaten vorzunehmen, um die Wahrscheinlichkeit selbstproduzierter Artefakte so gering wie möglich zu halten. Aus diesem Grunde wurden jeweils zwei Arten der Normierung und der Gewichtung der Daten bei der Erstellung der Anpassungskurven anhand des linear-quadratischen Modells mit Hypersensitivitätsterm nach Marple und Joiner benutzt. Für Photonen zeigte sich, wie erwartet, die in der Literatur schon gut dokumentierte Hypersensitivität mit folgender erhöhter Radioresistenz im Dosisbereich unter 0,5 Gy.

In den Experimenten mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen (LET: 27,5 keV/μm) trat ebenfalls eine Hypersensitivität auf, wobei der Kurvenverlauf im Vergleich zu den Photonenexperimenten zu niedrigeren Dosen verschoben war. In Bezug auf den LET können die hier vorgestellten Ergebnisse am ehesten mit den von Marples durchgeführten Experimenten mit Pionen in verglichen werden. Während Plateau-Pionen (LET: 10-20 keV/u) ebenfalls eine Hypersensitivität erzeugten, war sie bei Experimenten mit Pionen im Bragg-Peak (LET: 35 keV/u) nicht ersichtlich. Allerdings muss in diesem Zusammenhang noch die unterschiedliche Bahnstruktur von Kohlenstoffionen und Pionen berücksichtigt werden. Die breitere Bahnspur von Kohlenstoffionen und die damit verbundene geringere Ionisationsdichte im Vergleich zu Pionenstrahlung bei gleichem LET lässt das Auftreten von reparaturbedingten Phänomenen bei Bestrahlung mit Kohlenstoffionen wahrscheinlicher werden.

Sowohl in den Experimenten mit Photonen als auch mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen wurde ein Ansteigen der absoluten Überlebenswerte im Bereich der induzierten Radioresistenz gemessen, bevor die Überlebenswerte bei höheren Dosen (> 1Gy) dann in typischer Weise abfielen. Dies spricht eindeutig für die These der induzierten Reparatur als Erklärung der Hypersensitivitätseffekte, da das Subpopulations-Modell einen absoluten Anstieg im Überleben nicht erklären kann. Allerdings ist auch der Einfluss von Bystander Effekten nicht auszuschließen und bildet eine interessante Fragestellung für weitere Experimente.

Die Auswertung der mittleren Zellzahlen überlebender Kolonien in Abhängigkeit von der Dosis zeigten für Photonen einen Kurvenverlauf, der den Bereich der Hypersensitivität und induzierten Radioresistenz widerspiegelt und für höhere Dosen die starke Reduktion der mittleren Zellzahl aufzeigt. Bei den Kohlenstoffionen war die Hypersensitivität dagegen zwar nicht so klar erkennbar wie in den Überlebenskurven, eine induzierte Radioresistenz und die starke Reduktion für hohe Dosen war jedoch deutlich zu sehen. Erklärungsansätze für die prinzipiellen Unterschiede beider Kurven lassen sich in Dosisrateneffekten vermuten.

Da sowohl die Überlebenskurve von Photonen, wie auch die von 100 MeV/u Kohlenstoffionen nicht über den gesamten Dosisbereich unter 0,5 Gy monoton fallend sind, ist es aufgrund der Definition der RBW nicht möglich, die RBW für diesen Bereich anzugeben. Die prinzipielle Ähnlichkeit beider Überlebenskurven in Bezug auf die gemessene Hypersensitivität ist allerdings mit den aus höheren Dosiswerten extrapolierten RBW-Werten konsistent. Präzise quantitative Bestimmung der RBW im Niedrigdosisbereich erfordern weitere Messungen im Bereich unterhalb von 0,1 Gy, um die Fehler der Anpassungsparameter weiter zu reduzieren.