

Georg Walter Sauer

Dr. med.

**Evaluierung der polarographischen pO<sub>2</sub>-Messung in R3327-AT-Experimentaltumoren durch die Quantifizierung von strahleninduzierten DNA-Schäden in situ mit dem Comet-Assay**

Geboren am 06.02.1973 in Basel/Schweiz

Reifeprüfung am 08.07.1992 in Erlangen

Studiengang der Medizin vom SS 1993 bis WS 1999

Physikum am 03.05.1995 an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen/Nürnberg

Klinisches Studium an der Karl-Ruprechts-Universität Heidelberg

Praktisches Jahr an der Medical School of Minnesota/USA und an der Karl-Ruprechts-Universität Heidelberg

Staatsexamen am 04.11.1999 an der Karl-Ruprechts-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Klinische Radiologie (Schwerpunkt Strahlentherapie)

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. M. Eble

Die relative Resistenz von Zellen gegenüber Bestrahlung unter niedrigen Sauerstoffpartialdruck ist ein lange bekanntes radiobiologisches Phänomen und bezieht seine Bedeutung aus dem möglichen Vorkommen hypoxischer Zellen in soliden Tumoren. Das in jüngerer Zeit neuerlich gestiegene Interesse, die hypoxische Fraktion für menschliche Tumoren individuell und im Sinne eines prädiktiven Assays zu bestimmen, resultiert nicht zuletzt aus der Entwicklung einer verbesserten polarographischen Mikroelektrode-technik (Eppendorf pO<sub>2</sub>-Histogramm). Klinische Untersuchungen weisen auf eine enge Korrelation zwischen der so ermittelten Hypoxie von Tumoren und ihren Therapieansprechen hin. Die polarographische Methode erfaßt vornehmlich eine interstitielle pO<sub>2</sub>-Verteilung, und die eigentlich interessierende radiobiologische Hypoxie zum Zeitpunkt einer Bestrahlung muß daraus impliziert werden. Da klassische experimentelle Verfahren zur strahlenbiologischen Bestimmung der hypoxischen Fraktion für den klinischen Einsatz ungeeignet sind, wurde vorgeschlagen, den für initiale Strahlenschäden – namentlich DNA-Strangbrüche – auftretenden Sauerstoffeffekt zu nutzen, und die Strangbruchrate in Zellen aus Tumorbiopsien unmittelbar nach einer klinisch

therapeutischen Exposition zu messen. Der Comet-Assay, eine mikroelektrophoretische Methode zur Ermittlung der DNA-Schädigung in individuellen Zellen, erscheint ein hierzu geeignetes Instrument. Ein direkter experimenteller Vergleich der beiden genannten Methoden zur Überprüfung einer Parallelität entsprechender Meßergebnisse sollte in der vorliegenden Studie am R3327-AT-Experimentaltumor der Ratte durchgeführt werden.

Der erste Teil dieser Arbeit widmete sich der methodischen Etablierung des Comet-Assay nach experimentellen Protokollen aus der Literatur und der Wahl geeigneter Analyseparameter bei der rechnergestützten Bildauswertung in der Fluoreszenzmikroskopie. In vitro kultivierte Zellen des AT-Tumors dienten in der Folge zur Bestimmung der Dosiswirkungsbeziehungen für das Comet-Meßsignal nach Bestrahlung sowohl für euoxische wie anoxische Bedingungen. Es zeigten sich im Dosisbereich bis 10 Gy (Euoxie) bzw. bis 25 Gy (Anoxie) lineare Induktionskurven, deren Steigungen im Verhältnis den erwarteten Sauerstoffverstärkungsfaktor (OER) von 2.4 zeigten. Comet-Messungen für verschiedene eingestellten Sauerstoffpartialdrucke folgten der bekannten  $O_2$ -Konzentrationsabhängigkeit zellulärer Effekte („Alper-Kurve“), mit einem  $pO_2$  von 5 mmHg für eine halbmaximale Radiosensibilisierung.

Nach Validierung der methodischen Voraussetzungen, wurden im zweiten Teil der Arbeit der Comet-Assay mit Zellen von in situ bestrahlten Dunning-Tumoren durchgeführt und mit den Ergebnissen der unmittelbar vor Bestrahlung erhobenen  $pO_2$ -Histogrammen verglichen. Um Einflüsse von Reparatur zu begrenzen, wurden die bestrahlten Tumoren rasch entnommen und sofort gekühlt, und die nachfolgenden Schritte der Zellvereinzelung bis zur Zellyse, soweit möglich, bei 4°C durchgeführt. Für die 8 untersuchten Tumoren zeigten sowohl die  $pO_2$ -Messungen als auch die Resultate zur Strangbruchinduktion im Comet-Assay eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität der Tumoroxygenierung, und die Korrelation der experimentellen Endpunkte mittlerer  $pO_2$  und mittleres Comet-Moment war statistisch hochsignifikant ( $p < 0.001$ ).

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, daß die Erfassung der interstitiellen Gewebeoxygenierung mittels Eppendorf-Histographie eine auf der Einzelzellebene radiobiologisch relevante Meßgröße darstellt.