

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Kommissarischer Direktor: Dr. med. Michael Ehmann)

Entwicklung, Validierung und Anwendung einer Methode zur
Xenonexposition und Bestrahlung von Glioblastom-Zellkulturen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Thomas Büttner

aus
Göttingen
2022

Dekan: Prof. Dr. med Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med Frank A. Giordano

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1 EINLEITUNG.....	2
1.1 Glioblastom: Theoretischer Hintergrund	2
1.1.1 Epidemiologie, Klassifikation, Ätiopathogenese	2
1.1.2 Klinik und Diagnostik	3
1.1.3 Aktuelle Therapieansätze und Prognose	4
1.2 Glutamatstoffwechsel im Glioblastom	5
1.3 Xenon als Glutamatantagonist.....	9
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	11
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Material.....	13
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	13
2.1.2 Geräte.....	13
2.1.3 Substanzen.....	14
2.1.4 Zelllinie	15
2.2 Gasexpositionsmethode.....	15
2.2.1 Aufbau und Wirkprinzip.....	15
2.2.2 Gaskonzentrationsberechnung.....	18
2.3 Validierung.....	18
2.3.1 Diffusion über die Mikroporenmembran.....	19
2.3.2 Dichtheitsprüfung der Gaslunge	20
2.3.3 Dichtheitsprüfung der verschlossenen Flaschen	20
2.3.4 Dosimetrie	21
2.4 Zellkultur	22
2.4.1 Grundlagen.....	22
2.4.2 Zählung.....	23

2.4.3	Fixierung und Anfärbung	23
2.4.4	Bestrahlung	24
2.5	Klonogener Überlebensassay	25
2.5.1	Gruppen und Zellzahlen	25
2.5.2	Vorbereitung	26
2.5.3	Bestrahlung und Gasexposition	26
2.5.4	Anschlussvorgehen	28
2.5.5	Auswertung und Datenanalyse	28
3	ERGEBNISSE	30
3.1	Gasexposition	30
3.1.1	Materialverbrauch und Handhabung	30
3.1.2	Gaskonzentrationen	31
3.2	Validierung	32
3.2.1	Diffusion über die Mikroporenmembran	32
3.2.2	Dichtheitsprüfung der Gaslunge	34
3.2.3	Dichtheitsprüfung der verschlossenen Flaschen	35
3.2.4	Dosimetrie	36
3.3	Klonogener Überlebensassay	37
3.3.1	Plating Efficiency	37
3.3.2	Surviving Fraction	38
3.3.3	Linear-Quadratisches Modell	39
4	DISKUSSION	41
4.1	Methodische Qualität	41
4.1.1	Materialbedingte Handhabung	41
4.1.2	Wirtschaftlichkeit	41
4.1.3	Validität	42
4.1.4	Reliabilität	45
4.1.5	Alternativmethoden	46
4.2	NMDA-Rezeptorantagonisten im Überlebensassay	47
4.2.1	Eigentoxizität	47

4.2.2	Strahlensensibilisierung.....	47
4.3	Fazit	48
5	ZUSAMMENFASSUNG	50
6	LITERATURVERZEICHNIS	51
7	SONSTIGES	57
8	LEBENS LAUF	58
9	DANKSAGUNG	60

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMPA(R)	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure(-Rezeptor)
Ca₂₊	Calcium (ionisiert)
CO₂	Kohlendioxid
ddH₂O	Destilliertes Wasser
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
GBM	Glioblastoma multiforme
Glu	Glutamat
Gy	SI-Einheit für Strahlendosis, 1 Gy = 1 J/kg
IDH	Isocitratdehydrogenase
LINAC	Linearbeschleuniger
μM	Mikromolar, 1 μ M = 1 μ mol/l
MU	Monitor Units
NMDA(R)	N-Methyl-D-Aspartat(-Rezeptor)
O₂	Elementarer Sauerstoff
PE	Plating Efficiency
PVC	Polyvinylchlorid
RCHT	Radiochemotherapie
SF	Surviving Fraction
T25	Zellkulturflaschen mit 25cm ² Kulturfläche
TMZ	Temozolomid
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
Xe	Xenon
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Glioblastom: Theoretischer Hintergrund

1.1.1 Epidemiologie, Klassifikation, Ätiopathogenese

Das Glioblastoma, auch Glioblastoma multiforme (GBM), ist ein Malignom des zentralen Nervensystems. Unter den malignen hirneigenen Tumoren ist es mit einem Anteil von etwa zwei Dritteln der häufigste [1, 2]. Die in den Vereinigten Staaten von Amerika aus den Jahren 1975-2018 berechnete jährliche Rate an Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner beträgt 2,99 [3]. Das GBM ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters, Patienten sind bei Erkrankungsbeginn im Median 64 Jahre alt. Männer sind mit einem Verhältnis von 1,6:1 häufiger betroffen als Frauen, bei ethnisch der kaukasischen Bevölkerung zugeordneten Einwohnern der USA war die Inzidenzrate etwa doppelt so hoch wie im dunkelhäutigen Bevölkerungsanteil (3,45 vs. 1,67/100.000) [1].

Bisher untersuchte genetische- und Umweltfaktoren konnten nur mit einem kleinen Teil der diagnostizierten Glioblastome ursächlich in Zusammenhang gebracht werden. Darunter konnten insbesondere die Vorbelastung mit ionisierender Strahlung sowie seltene hereditäre Syndrome (u.a. Tuberöse Sklerose, Neurofibromatose Typ I und II, Li-Fraumeni-Syndrom) als Risikofaktor identifiziert werden. Für den weitaus größten Anteil der GBM fehlt nach wie vor der Nachweis von spezifischen Risikofaktoren, sodass mehrheitlich von einem sporadischen Auftreten ausgegangen wird [4].

Zur Einteilung hirneigener Tumoren ist weltweit die *WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems* gebräuchlich. Ausgehend von histologischen sowie genotypischen Merkmalen, die als Marker für Malignität und Aggressivität dienen, erfolgt dabei die Einteilung in die vier Grade 1-4. Mit steigender Gradation korreliert zunehmend malignes Wachstumsverhalten sowie eine entsprechend ungünstigere Prognose. Das Glioblastom wird hierbei in die höchste Kategorie eingeordnet und folglich als *WHO-Grad 4* bezeichnet [5, 6].

Treibermutationen sind unter anderem Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens (*epidermal growth factor*) und Deletion der Tumorsuppressorgene PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) und CDKN2A (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*) [7, 8].

Glioblastomzellen sind neuroepithelialer Herkunft und werden aufgrund ihrer histopathologischen Eigenschaften als Tumoren des neuronalen Stützgewebes, der Glia, eingestuft [9]. Das mikroskopische Bild ist vielseitig, was zum Beinamen „multiforme“ geführt hat, und gekennzeichnet durch Kernatypien, Zellpleomorphismus,

erhöhte Mitoseaktivität, Gefäßproliferationen und Nekrosen [7, 8]. Dabei werden die in der Glia vorherrschenden Zellentypen, Astrozyten und Oligodendrozyten, sowie deren Vorläufer, neuronale Stammzellen, als mögliche Ursprungszellen diskutiert [10].

Neuere Erkenntnisse sprechen insbesondere den neuronalen Progenitorzellen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese zu, wobei sich die Mutation dabei auf die Stammzellen selbst noch nicht auswirkt, sondern erst in deren Teilungsprodukten, etwa astrozytischen oder oligodendritischen Tochterzellen, zur Entartung führt [11]. Genetische Untersuchungen des gesunden Hirngewebes von GBM-Patienten konnten Glioblastom-Treibermutationen bereits in sogenannten *Astrozyten-ähnlichen neuronalen Stammzellen* der zentral gelegenen subventrikulären Zone des Gehirns identifizieren. Die Mutationslast in diesen Zellen lag dabei weit unterhalb der Entartungsschwelle. Im Maus-Modell konnte daraufhin die Migration dieser Stammzellen in die Hirnperipherie gezeigt werden, die anschließend dort zur Entstehung hochgradig maligner Gliome führte [12].

Letztendlich ist die Ätiopathogenese von Glioblastomen nicht vollständig entschlüsselt, die kausalen Treibermutationen und die klinische Manifestation als Malignom scheinen jedoch räumlich und zeitlich nicht zwingend in Zusammenhang zu stehen.

1.1.2 Klinik und Diagnostik

Das Glioblastom wird klinisch apparent aufgrund seines raumfordernden Charakters. Durch die rasche Progredienz können die Symptome mitunter wie ein Schlaganfall imponieren. Unspezifische Symptome wie Kopfschmerzen werden bei etwa der Hälfte der Patienten beobachtet, sind allerdings differentialdiagnostisch nicht aufschlussreich. Kognitive Einbußen und Persönlichkeitsveränderungen werden vor allem bei älteren Betroffenen häufig als dementielle Entwicklung fehlinterpretiert.

Spezifischer sind dagegen durch funktionell verdrängendes Wachstum bedingte fokalneurologische Symptome. Paresen, Parästhesien oder Gesichtsfeldausfälle etwa können dabei bereits einen Anhalt für die anatomische Lokalisation geben. Bei etwa 20-40% der Patienten geschieht die Erstmanifestation der Erkrankung als Krampfanfall, üblicherweise fokal oder sekundär generalisiert [13].

Bei klinischem Verdacht wird die Diagnose durch Magnetresonanztomographie des Schädels mit und ohne Kontrastmittel gesichert. Die typische radiologische Darstellung des GBM ist eine heterogene, infiltrative, ringförmig Kontrastmittel anreichernde Läsion mit zentral nekrotischen Anteilen sowie perifokalem Ödem [13, 14]. Anatomisch findet sich das Glioblastom vorwiegend im Bereich der Hemisphären des Großhirnes sowie den Stammganglien, teilweise unter Überschreitung der Mittellinie [15].

1.1.3 Aktuelle Therapieansätze und Prognose

Die aktuell gängige Therapie enthält zunächst, wenn möglich, die neurochirurgische Tumoresektion unter Schonung von vitalem Hirngewebe mit anschließender Strahlen- und Chemotherapie [16, 17]. Dabei ist aufgrund des infiltrativen Wachstumsmusters von Glioblastomen und der erschwerten Abgrenzung zu gesundem neuronalem Gewebe eine Resektion in toto allerdings unwahrscheinlich [18, 19]. Der Stellenwert der adjuvanten Therapie ist entsprechend hoch [20].

Die Strahlentherapie wird beim Glioblastom perkutan durchgeführt und basiert auf der Induktion von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der Tumor-DNA. Diese Strangbrüche werden nun durch Reparaturmechanismen wiederhergestellt. Falls dies nicht gelingt, kann eine unmittelbare Apoptose der Tumorzelle die Folge sein. Im Falle einer fehlerhaften Reparatur können chromosomale Translokationen und genomische Instabilität die Folge sein, welche die weitere Tumorzellteilung behindern [21]. Beim GBM beträgt die Gesamtdosis 60 Gy, fraktioniert auf fünf Einzeldosen von 2 Gy pro Woche über insgesamt 6 Wochen [22, 23]. Dabei umfasst das Bestrahlungszielvolumen den radiologischen Tumorherd sowie circa 2 cm des umgebenden Hirngewebes [24]. Ein Problem der Bestrahlung stellt die Toxizität dar: Aufgrund der Kollateralschädigung des gesunden Hirngewebes können schwere und irreversible Nebenwirkungen bis hin zur Radionekrose auftreten, welche die Gesamtdosis und die Ausdehnung des Strahlenfelds limitieren. Die häufigsten Nebenwirkungen sind kognitive Einbußen, vor allem bei Merk- und Konzentrationsfähigkeit [22]. Die unerwünschten Ereignisse stellen nicht nur für eine zusätzliche Belastung für Patienten dar, sondern limitieren die Bestrahlung in ihrer Gesamtdosis.

Unterschiedliche molekulare Mechanismen, darunter eine erhöhte Reparaturkapazität strahlungsinduzierter Doppelstrangbrüche, verleihen Gliomen gegenüber ionisierender Strahlung primär eine hohe Resistenz [23]. Deswegen könnten Substanzen, die das Tumorgewebe etwa durch Unterbindung von DNA-Reparaturmechanismen für die Bestrahlung sensibilisieren, hier therapeutisch nutzbar sein. Der Einsatz dieser sogenannten *Radiosensitizer* lässt auf ein verbessertes Radiotherapieansprechen ohne zusätzliche Strahlenexposition hoffen. Experimentelle In-vitro-Daten zeigen, dass eine Behinderung der DNA-Reparatur mit den PARP-Inhibitoren (Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Inhibitoren) ABT-888 (Veliparib) oder KU-0059436 (Olaparib) das klonogene Wachstumspotential von GBM-Zellen nach Bestrahlung herabsetzt [25, 26]. Aktuelle klinische Phase I-II-Studien gründen auf diesem Ansatz der PARP-Inhibition [27].

Neben der Radiotherapie kann die Systemtherapie mit dem Alkylans Temozolomid (TMZ) die Prognose bei GBM-Patienten verbessern. In der Mehrzahl der Fälle zeigt sich der Tumor jedoch therapieresistent gegenüber TMZ. Grund dafür ist die

tumoreigene Reparatur von DNA-Alkylierungsschäden durch die *O⁶-Methylguanin DNA-Methyltransferase* (MGMT), deren Aktivität vom Methylierungsstatus des MGMT-Promoters im Genom abhängig ist [28]. Bei Minderung der Genexpression mittels epigenetischer MGMT-Promotormethylierung ist der Überlebensvorteil durch TMZ-Chemotherapie größer, diese Patienten könnten neueren Studien zufolge auch von der zusätzlichen Gabe eines weiteren Alkylans, Lomustin, profitieren [29].

Gegenstand weiterer laufender Untersuchungen ist die Erhaltungstherapie nach abgeschlossener Initialtherapie. Zielgerichtete Therapeutika basierend auf molekularer Charakterisierung (z.B. Tyrosinkinase- oder PD-L1-Inhibitoren), Inhibition der Tumorneovaskularisation (z.B. CXCL12/CXCR4-Inhibitoren) oder die Generierung einer spezifischen Immunantwort durch Entwicklung einer Tumorstoffimpfung sind Gegenstand aktueller Forschung [30-32]. Während mithilfe dieser sogenannten *Targeted Therapies* in der Behandlung anderer Tumorentitäten große Erfolge verzeichnet werden konnten, liegen beim GBM derartige Daten bislang nicht vor [31, 33, 34].

Unbehandelt führt die Erkrankung in der Regel innerhalb weniger Monate zum Tod [35]. Die therapeutischen Möglichkeiten der operativen Resektion und adjuvanten Radiochemotherapie (RCHT) können das mediane Überleben (*Overall Survival*, OS) auf 14,6 Monate verlängern [17]. Ein prognostisch relevanter Faktor ist der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors (OS: 21,7 Monate methyliert vs. 12,7 Monate unmethyliert) [5, 36].

Insgesamt betrachtet ist die Prognose der Erkrankung weiterhin ungünstig und der wissenschaftliche Durchbruch in der Therapie von Glioblastoma multiforme bislang nicht gelungen. Vielversprechend und noch nicht ausgeschöpft erscheint das Potential eines tumorspezifischen Radiosensitizers.

1.2 Glutamatstoffwechsel im Glioblastom

Glutamat (Glu) ist im menschlichen Gehirn der bedeutendste exzitatorische Neurotransmitter. Es ist als solcher an nahezu allen höheren neurologischen Prozessen beteiligt, beinahe alle Zellen des zentralen Nervensystems können durch Glutamat erregt werden. Chemisch betrachtet handelt es sich um eine Aminosäure, die ihre Wirkung über verschiedene ionotrope und metabotrope Rezeptoren entfaltet [37]. Die beiden im Folgenden beschriebenen Rezeptoren besitzen für die vorliegende Arbeit besondere Relevanz:

- NMDAR (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor): Ligandengesteuerter Ionenkanal, zusammengesetzt aus sogenannten *GluN1* und *GluN2*-Untereinheiten mit multiplen Bindungsstellen für Glutamat sowie eine Vielzahl von endogenen oder

synthetischen Agonisten und Antagonisten (siehe Abb.1). Eine Aktivierung bewirkt den Einstrom von Kationen, hauptsächlich Ca^{2+} [37].

- AMPAR (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure-Rezeptor): Ligandengesteuerter Ionenkanal mit singulärer Bindungsstelle für Glutamat und synthetische Agonisten und Antagonisten. Aktivierung bewirkt Einstrom von Kationen, vor allem Na^+ . Je nach Konfiguration der *GluR1-GluR4* Untereinheiten ist der Rezeptor für Calcium mehr oder weniger permeabel [37].

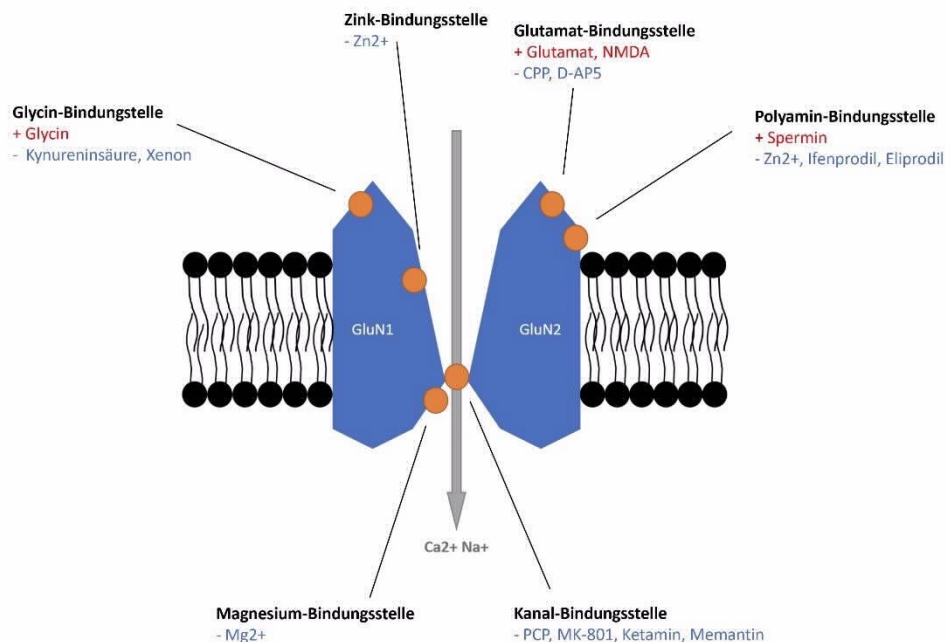


Abb. 1: NMDA-Rezeptor mit Bindungsstellen und ausgewählten Agonisten (rot) und Antagonisten (blau). Modifiziert nach Magnusson [38], Ghasemi [39] und Alam [40].

Während der physiologische Glutamatstoffwechsel für neuronale Zellen unverzichtbar ist, hat Glu in erhöhten Konzentrationen auf diese eine apoptotische Wirkung. Grund dafür ist der NMDAR-vermittelte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, diese führt zu dauerhafter Exzitation mit letztendlich zytotoxischem Effekt. Klinisch relevant wird diese *Exzitotoxizität* beispielsweise bei hypoxischen oder ischämischen intrazerebralen Pathologien [37].

Aufgrund ihrer neuroepithelialen Abstammung haben Glioblastome eine Reihe zellbiologischer Eigenschaften mit dem Nervengewebe gemeinsam. Darunter zählt das Expressieren von glutamatergen NMDA- und AMPA-Rezeptoren, außerdem die Sekretion von Glutamat in das umliegende Gewebe [20, 41, 42]. Dabei entzieht sich das GBM den physiologischen Regelkreisen und sezerniert Glutamat in weitaus

höheren Konzentrationen als im neuronalem Gewebe üblich [42]. In der Folge kommt es zu vermehrter NMDA/AMPA-Rezeptoraktivierung sowohl an den Tumorzellen selbst als auch in der unmittelbaren Tumorumgebung. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass dadurch Tumorstadium, -invasion sowie Strahlenresistenz begünstigt werden:

- Die tumoreigene Glu-Sekretion führt zu exzitotoxischer Glutamatkonzentration in der Mikroumgebung. Dadurch kommt es zur Apoptose der angrenzenden neuronalen Zellen und weitestgehend ungehinderten Tumorausbreitung. Die Glutamatexkretion geht soweit, dass primäre Neuronen in gemeinsamem Medium mit GBM-Zelllinien nicht kultiviert werden können und zugrunde gehen. Die Zugabe des NMDAR-Antagonisten MK-801 (Dizocilpin) in die Zellkultur kann dagegen die neurotoxische Wirkung der Gliomzellen komplett aufheben [42].
- Glutamatbindung an speziellen Ca^{2+} -durchlässigen AMPA-Rezeptoren, die von Glioblastomzellen exprimiert werden, vermittelt über die nachgeschaltete Serin-Threonin-Proteinkinase Akt (Proteinkinase B) Tumorstadium und -migration [43]. Die Expression dieser AMPAR wird im GBM durch Bindung von Glutamat am NMDA-Rezeptor gefördert [44]. Damit ist Glutamat über beide Mechanismen am Tumorstadium und -invasion beteiligt. Aufgrund der verstärkten tumoreigenen Glutamatsekretion kommt es dabei zur Entwicklung von auto- und parakrinen Stimulationsloops [43]. Außerdem erfolgt eine Stimulation möglicherweise zusätzlich über funktionelle NMDAR/AMPA-Synapsen zwischen Glioblastomen und neuronalem Gewebe, welche niedriggradigere Gliome nicht ausbilden [41]. Experimentelle Ansätze zeigen, dass die Zugabe von NMDA-Rezeptorantagonisten die Proliferation und Invasion von GBM-Zelllinien einschränken kann [20, 44-46]. Weiterhin kann nach Inhibition der Ca^{2+} -permeablen AMPA-Rezeptoren die Apoptose der Tumorzellen beobachtet werden [47].
- Die über Glutamatbindung am NMDA-Rezeptor vermittelte erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration führt zu einer verbesserten Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) in Glioblastomzellen [20]. Dieser Mechanismus trägt zur Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung bei [23]. Versuche zeigen, dass die Zugabe des NMDAR-Antagonisten Memantin in GBM-Zelllinien die Anzahl der unreparierten DSB nach Bestrahlung erhöhten kann. Auch das klonogene Wachstumspotenzial nach Strahlenexposition konnte mit steigender Dosis zunehmend gehemmt werden [20].

Zusammenfassend sorgt die erhöhte Glutamatkonzentration also für Zelluntergang im gesunden neuronalen Gewebe, während an Gliomzellen das Wachstum stimuliert und die Strahlenresistenz gefördert wird. In den beschriebenen in vitro-Experimenten waren diese Mechanismen außerdem antagonisierbar. Als therapeutischer

Ansatzpunkt erscheint der Glutamatstoffwechsel deswegen geeignet, wobei als Zielstrukturen sowohl AMPA- als auch NMDA-Rezeptoren infrage kommen.

In vivo ist der Einsatz dieser Glutamatrezeptorantagonisten allerdings nicht uneingeschränkt möglich, da Glu als wichtigster exzitatorischer Neurotransmitter an nahezu allen neurologischen Funktionen beteiligt ist und eine generalisierte Rezeptorblockade zu dosislimitierenden Nebenwirkungen - Schläfrigkeit und Halluzinationen bis hin zum Koma - führt [48, 49]. Der Einsatz von nichtkompetitiven Antagonisten ist klinisch besser verträglich, da diese ihre Wirkung vor allem an pathologisch überaktiven Rezeptoren entfalten. Ein Beispiel hierfür ist das Amantadinderivat Memantin, das in Deutschland eine Zulassung in der Behandlung der Demenz vom Alzheimer-Typ hat und als NMDA-Rezeptorantagonist wirkt [49].

Memantin wirkt antiproliferativ und pro-apoptotisch auf Glioblastomzellen, die in vitro durchschnittlich letale Dosis (LD₅₀) beträgt $26 \pm 11 \mu\text{M}$ [20]. In Kombination mit Bestrahlung zeigt Memantin eine zusätzliche zytotoxische Wirkung. Signifikante Minderungen des klonogenen Potenzials konnten in vitro bei einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ festgestellt werden. Der strahlungsinduzierte Faktor der Zytotoxizitätssteigerung von $50 \mu\text{M}$ Memantin beträgt 1,4 bei 2 Gy, sodass von einem *Radiosensitizer* gesprochen werden kann [20]. Bei der Übertragung dieser Erkenntnisse in vivo sind allerdings Pharmakokinetik und Nebenwirkungen zu beachten, die derartige Konzentrationen nicht zulassen. Im Mausmodell konnten selbst unter Gabe der maximalen Akutdosierung von 5 mg/kg nur Memantinspiegel von $1,0 \mu\text{M}$ im Serum gemessen werden. Die in der Behandlung der Demenz übliche Tagesdosierung von 20 mg Memantin führt im Menschen zu Serumspiegeln von $0,32\text{-}0,37 \mu\text{M}$. Die Konzentration im Liquor liegt dabei stets geringfügig darunter [50].

Trotzdem können bereits therapeutische Memantinspiegel von $1\text{-}2 \mu\text{M}$ das Wachstum von GBM in Mäusen verlangsamen. Der Effekt wird dabei nicht auf die direkte antiproliferative Wirkung des Medikaments zurückgeführt, sondern auf die Wachstumseinschränkung durch Protektion umliegendes neuronalen Gewebes vor glutamaterger Exzitotoxizität [51]. Eine klinische Phase-I-Studie, in der Memantin (in Kombination mit Temozolomid) erstmals an Glioblastompatienten angewendet wurde, verzichtete daher auf dessen Eigenschaften als *Radiosensitizer* und beschränkte die Anwendung auf die tumorstatische Therapie nach abgeschlossener Radiatio, hierbei konnte ergaben sich keine Sicherheitsbedenken [52]. Phase-II-Studien sind bisher nicht erfolgt, einer weitere Phase-I-Studie zur Untersuchung der Überlebensendpunkte ist aktiv (*ClinicalTrials.gov Identifier*: NCT01430351). In der klinischen Praxis konnte sich Memantin bisher nicht durchsetzen [53]. Mutmaßlich ist dies durch fehlende höherwertige klinische Studien bedingt.

Talampanel, ein nichtkompetitiver AMPAR-Antagonist und somit Inhibitor des Glutamatstoffwechsels wurde bereits im Rahmen einer Phase-II-Studie an Glioblastompatienten geprüft. Dabei ergaben sich Hinweise auf einen Überlebensvorteil bei Einnahme unter simultaner RCHT [54]. Auch hier steht ein Transfer in die klinische Anwendung aufgrund fehlender Phase-III-Daten aus [55].

Der Glutamatstoffwechsel im Glioblastom stellt somit einen pathogenetischen Faktor mit einer Reihe von möglichen therapeutischen Ansatzpunkten dar. Die Anforderungen an ein optimales Präparat sind dabei vielfältig: Idealerweise müsste ein nichtkompetitiver Antagonismus sowohl an NMDA- als auch AMPA-Rezeptor bei gleichzeitig ausreichender Verfügbarkeit im Zielgewebe und guter Verträglichkeit im Hinblick auf Nebenwirkungen gegeben sein. Eine solche Substanz könnte dann auf Tumorzellen antiproliferativ wirken, bei gleichzeitiger Protektion umliegender neuronalen Gewebes. Insbesondere in Kombination mit adjuvanter Radiotherapie könnte sich daraus ein Überlebensvorteil ergeben. Die Literatur einschließlich Phase-II-Studiendaten unterstützt dieses Konzept, allerdings ist der Schritt in den klinischen Alltag noch nicht erfolgt.

1.3 Xenon als Glutamatantagonist

Das chemische Element Xenon (Xe) ist ein nicht entflammbares, nicht explosives Edelgas und unter Standardbedingungen farb- und geruchlos. In der natürlichen Erdatmosphäre kommt es in einer Konzentration von <0.0875 ppm (parts per million) vor und kann in einem energieaufwendigen Verfahren aus dieser gewonnen werden, entsprechend hoch sind die Herstellungskosten [56]. Im menschlichen zentralen Nervensystem wirkt Xenon an glutamatergen Rezeptoren als Antagonist und kann somit therapeutisch genutzt werden [57]. Eine Reihe besonderer pharmakologischer Eigenschaften machen den Einsatz im medizinischen Bereich attraktiv:

- Xenon wird inhalativ über die Alveolen aufgenommen, aufgrund des Blut-Gas-Verteilungskoeffizienten von 0,115 kommt es zu einer raschen Anflutung im Organismus [58].
- Als lipophiles und nahezu inertes Edelgas unterliegt es keiner endogenen Metabolisierung und verteilt sich zügig in sämtlichen Geweben auch jenseits der Blut-Hirn-Schranke ohne Einfluss von Transportmechanismen, First-Pass-Effekt oder Endothelfunktion [59-61].
- Es sind bislang keine toxischen, allergenen, mutagenen oder kardiovaskulären Nebenwirkungen bekannt, einzig eine Steigerung des cerebralen Blutflusses [56, 60].
- Die Ausscheidung erfolgt letztendlich unverändert wieder über die Alveolen, unbeeinflusst von Leber- und Nierenfunktion [62].

Seine Wirkung entfaltet Xenon als Antagonist an zentralnervösen glutamatergen NMDA-, AMPA-, und Kainat-Rezeptoren [57]. Während die beiden letzteren Rezeptoren erst seit kurzem mit Xenon in Zusammenhang gebracht werden, ist die Wirkung als NMDAR-Inhibitor seit mehreren Jahrzehnten erforscht. Die Bindung wird dabei an der Glycin-Bindungsstelle des Rezeptors vermutet (siehe Abb.1) und ist nichtkompetitiv [40]. Die Wirkung steigert sich mit der alveolären Konzentration, und wird bei Konzentrationen unter 50% der Atemluft als euphorisierend, entspannend und

schmerzlindernd beschrieben, ohne dabei die psychotomimetischen Nebenwirkungen anderer NMDAR-Inhibitoren wie Ketamin zu induzieren [61, 63]. Ab etwa 50% treten Bewusstseinseinschränkungen auf, und schließlich mit einer MAC₅₀ (mittlere alveoläre Konzentration) von 63-71% die Narkose [56]. Diese Wirkung wurde erstmals 1951 anästhesiologisch von Cullen und Gross für einen operativen Eingriff genutzt [64]. Mittlerweile wurde in mehreren Ländern der europäischen Union, unter anderem in Deutschland, „Xenon pro Anaesthesia“ als Arzneimittel zugelassen [65]. Aufgrund der Pharmakodynamik und des Nebenwirkungsprofils gilt Xenon dabei insbesondere für kardiovaskuläre Risikopatienten als nahezu ideales Anästhetikum [66].

Neben der anästhetischen Wirkung ist in den letzten Jahren ein neuroprotektiver Effekt zunehmend in den Fokus gerückt. Vermittelt durch die Blockade glutamaterger Rezeptoren kann Xenon neuronales Gewebe vor exzitotoxischem Stress durch erhöhte Glutamatkonzentrationen schützen [61]. Hypoxisch-ischämische Hirnschäden können deswegen im Tierversuch durch Xe vermindert werden [67]. Hinweise darauf, dass der neuroprotektive Effekt therapeutisch nutzbar sein könnte, gibt es bislang unter anderem für Patienten mit Alzheimer-Krankheit, überlebtem Herzstillstand, sowie Neugeborenen-Asphyxie [68-70]. Für letztere Indikation ist mittlerweile die EU-weite Zulassung von Xenon unter *Orphan-Drug-Status* erfolgt. Klinische und präklinische Studien zeigen dabei, dass der neuroprotektive Effekt bei Asphyxie von einem raschen Therapiebeginn sowie einer Dosis von $\geq 50\%$ alveolärer Konzentration abhängig zu sein scheint [70]. Eine Phase-III-Studie untersucht aktuell den Einfluss einer 50%-Xe-Beatmung in Kombination mit intensivmedizinischer Hypothermiebehandlung auf das funktionelle Outcome von Patienten mit wiederhergestelltem Spontankreislauf nach Herzstillstand [71].

Zusammenfassend scheint Xenon nach aktuellem Forschungsstand also ein Glutamatantagonist an sowohl NMDA- als auch AMPA-Rezeptoren mit hervorragender Liquorgängigkeit zu sein. Das Nebenwirkungsprofil ist dabei in subanästhetischen Konzentrationen bis etwa 50% der Atemluft gut tolerabel. Für die adjuvante Behandlung des Glioblastoma multiforme ist der Einsatz des Edelgases aus mehreren Gründen vielversprechend. Denkbar wäre, dass Xenon aufgrund der nichtkompetitiven NMDA-Inhibition, ähnlich wie Memantin, an Glioblastomzellen einen *radiosensitizing*-Effekt haben könnte. Andererseits könnte die Protektion gesunden neuronalen Gewebes zu einer Abmilderung der neurotoxischen Bestrahlungsnebenwirkungen führen. Diese Eigenschaften verliehen Xenon das Profil eines idealen Kandidaten zum Einsatz parallel zur Hirnbestrahlung.

In der Forschung ist Xenon bislang größtenteils als Narkosegas für anästhesiologische Zwecke oder als Bildverstärker für radiologische Fragestellungen untersucht worden. Eine Literaturrecherche bringt nur zwei Arbeiten hervor, in denen der direkte Effekt von Xenon auf Tumorzellen beobachtet wurde. Eine In vitro-Arbeit konnte einen

antimigrativen Effekt auf Mammakarzinomzellen zeigen, eine Forschungsreihe an Mäusen ermittelte keine Wachstumsinhibition von Hepatomen, wenn Xenon anstatt CO₂ zur Etablierung eines laparoskopischen Pneumoperitoneums verwendet wurde [72, 73]. Eine Untersuchung der Kombination von Xe, ionisierender Strahlung und den Zellen hirneigener Tumoren ist bislang nicht veröffentlicht worden. Entsprechend ist aktuell auch noch keine wissenschaftliche Methode für einen solchen experimentellen Versuchsaufbau bekannt.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit soll einen ersten Schritt in der Erforschung der Auswirkungen von Xenon auf die strahlentherapeutische Behandlung von Hirntumorpatienten darstellen.

Ziel ist es dabei zunächst eine Methode zu etablieren, die es erlaubt Zellkulturen gegenüber Xenongas zu exponieren. An die Methodik werden dabei die folgenden Anforderungen gestellt, sodass keines der etablierten Verfahren genutzt werden kann:

- Um gleichbleibende Rahmenbedingungen zu schaffen, sollte die Konzentration von Xenon in der Zellkulturatmosphäre nachvollziehbar sein und außerdem in ihrer Dosis eine Übertragung in vivo ermöglichen.
- Die Xenonexposition der Zellkulturen soll in unmittelbarem zeitlichem Zusammenhang mit einer Behandlung durch ionisierende Strahlung stehen. Die mögliche NMDA-Rezeptor-vermittelte Inhibition der Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist in größeren zeitlichen Abständen zur Radiatio nicht sinnvoll, da DSB in Glioblastomzellen schon innerhalb weniger Stunden nach Bestrahlung repariert werden können [20].
- Die Xenonexposition der Zellkulturen darf kein Risiko für eine Kontamination der Zellkulturen mit Bakterien darstellen oder gegen generelle Grundregeln im Umgang mit Zellkulturen verstoßen.
- Aufgrund ökonomischer Gesichtspunkte soll der Xenonverbrauch möglichst geringgehalten werden. Xenon ist in der Herstellung und im Einkauf teuer, der Erwerb von *Medical Grade Xenon* für medizinische Zwecke ist mit einem zusätzlichen Preisaufschlag verbunden. Für die Verwendung an Zellkulturen wird außerdem ein industriell hergestelltes Gasgemisch mit Anteilen anderer Gase benötigt. Die Kosten für diese Mischung belaufen sich auf ca. 12 € pro Liter (eigene Rechnung, AirLiquide GmbH). Langfristige Inkubation in großvolumigen Laborbrutschränken ist von daher nicht wirtschaftlich.
- Die Methodik muss wiederholt zuverlässig einsetzbar sein, um eine möglichst große Anzahl von Zellkulturen innerhalb kurzer Zeit ohne massiven Einsatz von Verbrauchsmaterialien gegenüber einer Gasmischung exponieren zu können. Dabei sollte ein *clonogenic assay* in fünf Bestrahlungsstufen mit jeweils drei Zellkulturansätzen pro Stufe – sogenannte *triplets* – in einer einzigen Runde durchführbar sein

Die Schwierigkeit besteht darin, das Verfahren zu validieren, denn zur Messung des atmosphärischen Xenongehalts direkt an der Zellkultur stehen keine Messgeräte zur Verfügung – der Nachweis muss somit auf indirektem Wege erfolgen:

- Messungen des Verhaltens physikalisch vergleichbarer Gase unter ähnlichen Bedingungen erlauben einen Rückschluss auf Bewegungen und Konzentration von Xenon.
- Die Messung dosimetrischer Aberrationen bei Bestrahlung lässt auf das Vorhandensein veränderter physikalischer Parameter durch veränderte atmosphärische Zusammensetzung schließen.

In einem anschließenden Arbeitsschritt sollen unter Anwendung dieser Methodik erste Versuche mit Xenongas und Radiatio an Glioblastom-Zellkulturen durchgeführt werden. Da Xenon einen Antagonismus am NMDA-Rezeptor zeigt, soll hierfür eine GBM-Zelllinie, von der die Expression funktioneller NMDA-Rezeptoren vorbeschrieben ist, genutzt werden. In drei unabhängigen Experimenten soll diese dann mittels *clonogenic assay* auf ihr klonogenes Wachstumspotenzial nach Bestrahlung und Exposition gegenüber einer 50 %-Xenonatmosphäre untersucht werden. Dabei soll der Einfluss von Xenon auch mit dem des NMDAR-Antagonisten Memantin verglichen werden, sowie das Ergebnis der Kombination beider Agenzien. Da Xenon und Memantin ihre inhibitorische Wirkung an zwei unterschiedlichen Bindungsstellen des NMDA-Rezeptors entfalten (siehe Abb.1), sind hier Synergieeffekte denkbar.

Neben dem Gewinn erster Erkenntnisse über zellbiologische Auswirkungen der Kombination von Bestrahlung und Xenonexposition auf Glioblastomzellen dient diese Versuchsreihe der Überprüfung, ob die neu entwickelte Methodik zuverlässig gemeinsam mit grundlegenden Methoden der strahlenbiologischen Forschung wie dem klonogenen Überlebensassay mit *in vitro*-Bestrahlung einsetzbar ist. Das Erzielen konstanter, reproduzierbarer Ergebnisse mit spezifischen Abweichungen bei Xenonzugabe sollte idealerweise als ein abschließendes Validierungskriterium der Methodik gelten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

FALCON™ Zellkulturflaschen, 25 cm ² Kulturfläche Schräghals, Gasaustauschkappe mit 0,2 µm Porenweite	Corning Inc Corning, NY, US
FALCON™ Zellkulturflaschen, 75 cm ² Kulturfläche Schräghals; Gasaustauschkappe mit 0,2 µm Porenweite	Corning Inc Corning, NY, US
FALCON™ 50 ml Röhren, konischer Boden, Polypropylen	Corning Inc Corning, NY, US
CELLSTAR™ 15 ml Röhren, konischer Boden, Polypropylen	Greiner Bio-One GmbH Kremsmünster, AT
Serologische Pipetten, steril, 2-25 ml	SARSTEDT AG Nümbrecht, DE
Safe-Lock Tubes, 1,5 ml	Eppendorf AG Hamburg, DE
epT.I.P.S.® Pipettenspitzen, 10µl-1000 ml	Eppendorf AG Hamburg, DE
Nalgene™ Kryoröhren, 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific Inc Waltham, MA, US
Beutel, Polyethylenfolie (PE-Folie), transparent	FIPP Handelsmarken GmbH Hamburg, DE
PMMA-Platten (Acrylglas), Schichtdicke 1 cm	PTW-Freiburg GmbH Freiburg im Breisgau, DE
Parafilm™ Verschlussfolie	Bemis Company Inc Neenah, WI, US

2.1.2 Geräte

HERAsafe® mikrobiologische Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific Inc Waltham, MA, US
accu-jet® pro Pipettierhelfer	BRAND GmbH Wertheim, DE
HERAcell™ 240i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc Waltham, MA, US

MyTemp™ H2200-H Wärmeschrank	Benchmark Scientific Edison, NJ, US
Neubauer-Zählkammer	BRAND GmbH Wertheim, DE
Research® plus Pipetten, 20 µl-1000 ml	Eppendorf AG Hamburg, DE
DM IL LED Lichtmikroskop	Leica Microsystems GmbH Wetzlar, DE
5810R Zentrifuge	Eppendorf AG Hamburg, DE
GOX 100 Sauerstoff-Messgerät, GOEL 370 Sensor	GMH Messtechnik GmbH Regenstauf, DE
CARBOCAP™ GM70 CO ₂ -Messgerät, GMP221 Sensorhandgriff	Vaisala Corporation Vantaa, FI
Synergy® Linearbeschleuniger	Elekta AB Stockholm, SE
Semiflex 31010 Ionisationskammer	PTW-Freiburg GmbH Freiburg im Breisgau, DE
UNIDOS ^{webl} ine Elektrometer	PTW-Freiburg GmbH Freiburg im Breisgau, DE
PMMA-Platten, 30x30 cm, Schichtdicke 1 cm	PTW-Freiburg GmbH Freiburg im Breisgau, DE

2.1.3 Substanzen

Gasmischung (I) 75 % Xe, 20 % O ₂ , 5% CO ₂ Fertigmischung in Druckflasche	Air Liquide Deutschlang GmbH Krefeld, DE
Gasmischung (II) 75 % N ₂ , 20 % O ₂ , 5 % CO ₂ Fertigmischung in Druckflasche	Nippon Gases Belgium NV Oevel, BE
Sauerstoff, mind. 99,5 % Reingas in Druckflasche	Nippon Gases Deutschland GmbH Düsseldorf, DE
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Katalog-Nr. FG 0445	Biochrom AG, Berlin, DE
HyClone™ fötales Kälberserum (FBS) Katalog-Nr. SV 30160.03	GE Healthcare Chicago, IL, US

ROTIPURAN® Methanol ≥99,9 % Katalog-Nr. 4627.6	Carl Roth GmbH Karlsruhe, DE
Trypsin, 2,5 % in PBS Katalog-Nr. L 2133	Biochrom AG, Berlin, DE
EDTA, ≥99 % Katalog-Nr. X 986.1	Carl Roth GmbH Karlsruhe, DE
ROTIPURAN® Essigsäure 100 % Katalog-Nr. 3738.5	Carl Roth GmbH Karlsruhe, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥99,5 % Katalog-Nr. 4720.2	Carl Roth GmbH Karlsruhe, DE
Kristallviolett, 1 g/l Katalog-Nr. T 123.3	Carl Roth GmbH Karlsruhe, DE
Trypanblau 0,4 % Lösung Katalog-Nr. T 8154	Sigma-Aldrich Corporation St. Louis, MO, US
Gibco™ Dulbecco's PBS-Lösung, steril (DPBS) Katalog-Nr. 14190144	Thermo Fisher Scientific Inc Waltham, MA, US
DPBS-Pulver, 9,55 g/l Katalog-Nr. L 182-50	Biochrom AG, Berlin, DE
Memantinhydrochlorid-Lösung 0,25 mg/ml Katalog-Nr. M 9292	Sigma-Aldrich Corporation St. Louis, MO, US

2.1.4 Zelllinie

Für die vorliegende Arbeit wurden humane Glioblastomzellen der Linie U87MG verwendet. Es handelt sich um eine etablierte Zelllinie, die in mehr als 2000 wissenschaftlichen Publikationen untersucht worden ist und nachweislich einen funktionellen NMDA-Rezeptor exprimiert [20]. Der Bezug erfolgte in kryokonservierter Form über das Labor für zelluläre und molekulare Radioonkologie an der medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg.

2.2 Gasexpositionsmethode

2.2.1 Aufbau und Wirkprinzip

Die Methode zur Gasexposition der Zellkulturen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt und basiert auf der Installation einer spezifischen Gasatmosphäre unmittelbar an der Zellkultur. Dafür werden die Zellen in Kulturflaschen mit Gasaustauschkappe (im Folgenden auch als *Flask* oder *T25* bezeichnet) zunächst in

einen transparenten Beutel aus Polyethylenfolie (sogenannte *Gaslunge*) verbracht, welcher dann innerhalb eines Behälters platziert wird.

Dieser Behälter wurde eigens hergestellt und besteht aus Acrylglasplatten von 1 cm Dicke, die bei Außenabmessungen von 17 x 20 x 16 cm ein Innenvolumen von 3780 ml definieren. Die obere Platte ist zum Zwecke der Zugänglichkeit abnehmbar und kann anschließend wieder verschlossen werden.

Ein Vinyl-Sauerstoffschlauch wird dem Behälter von extern zugeführt und ins Innere des Folienbeutels (*Gaslunge*) eingebracht. Das innere Schlauchende und die Beutelöffnung der Polyethylenfolie werden miteinander luftdicht verbunden und bilden daraufhin ein zusammenhängendes, von der Raumluft abgeschlossenes System. Einzig der Zugang über das andere Ende des Vinylschlauches erlaubt dabei atmosphärische Manipulationen im Inneren der *Gaslunge*.

Danach wird zunächst durch Anlegen eines Soges am externen Schlauchende die Luft aus dem System entfernt, bis sich die PE-Folie luftleer an die Zellkulturflaschen angelegt hat. Das flexible Material sorgt dabei für ein äußerst geringes Residualvolumen. Die Luftdichtigkeit des Systems kann währenddessen über eine optische Kontrolle bestätigt werden, im Falle einer Leckage kann die *Gaslunge* nicht vollständig luftentleert werden. Die Vorbereitung endet mit dem Abklemmen des äußeren Schlauchendes durch eine stumpfe Klemme.

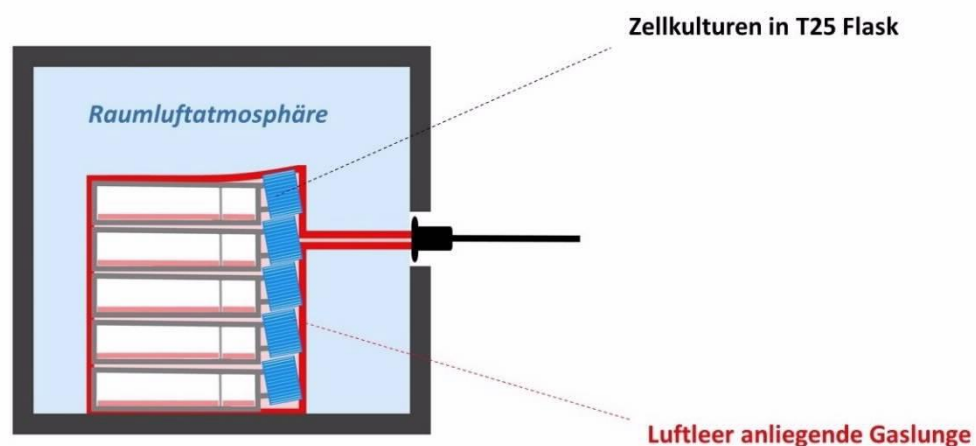


Abb.2: Vorbereitung der Gasexposition

Im nächsten Schritt wird über das externe Schlauchende eine Gasdruckflasche angeschlossen. Nach Öffnen der Klemme und des Auslassventils der Gasflasche strömt diese entlang des Druckgefälles in die *Gaslunge*. Durch deren zunehmende Ausdehnung wird die Raumluft im Acrylglasbehälter langsam verdrängt. Die optische Kontrolle sichert die materialschonende graduelle Entfaltung der PE-Folie. Ein zwischengeschalteter Druckminderer sorgt während des Vorganges für niedrige Spitzendrücke im System.

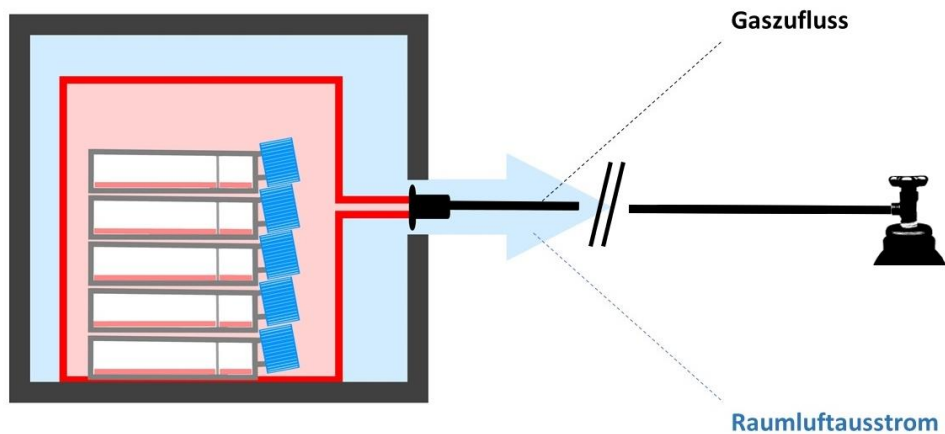


Abb.3: Ausdehnung der Gaslunge unter Gaszufluss.

Der Gaszufluss wird beendet, wenn die Gaslunge sich entfaltet hat und das Volumen des Behälters an den Innenwänden anliegend vollständig ausfüllt. Das externe Schlauchende und damit das gesamte System wird daraufhin mit der Klemme verschlossen. Im Inneren der Gaslunge beginnt währenddessen die Diffusion der Gase über die Mikroporen in der Deckelmembran der Zellkulturflaschen. Für die Dauer dieses Vorganges bleibt das System geschlossen.

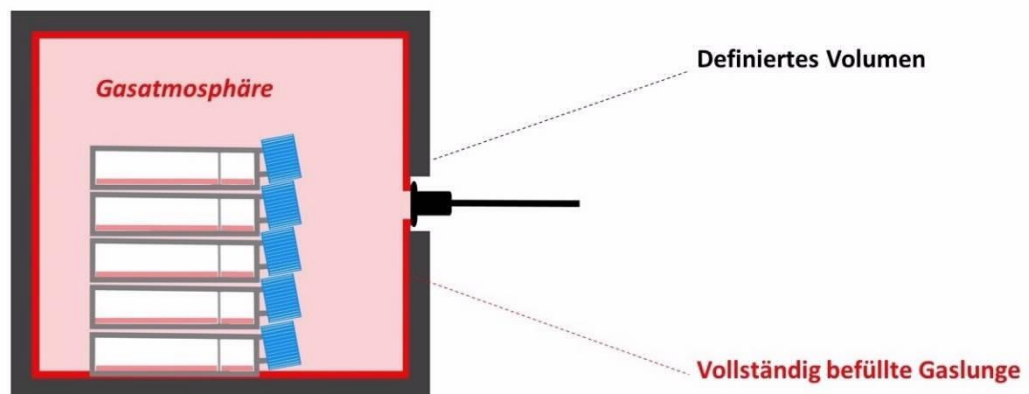


Abb.4: Abschluss des Vorgangs.

Nach dem Abschluss der Diffusion haben sich die Gasvolumina neu verteilt, und auf beiden Seiten der Deckelmembran hat sich ein Äquilibrium mit gleichen Gaskonzentrationen eingestellt. Die Äquilibriumkonzentration $c(\text{Ä})$ kann für jedes beteiligte Gas mit bekannter Initialkonzentration in der Zellkulturflasche $c(\text{Flask})$ und in der zugeführten Gasmischung $c(\text{Gasmischung})$ berechnet werden.

2.2.2 Gaskonzentrationsberechnung

Für die Berechnung von $c(\ddot{A})$ müssen neben den initialen Gaskonzentrationen folgende Volumina bekannt sein:

- Das Behältervolumen $V(\text{Behälter})$
- Das Innenvolumen einer T25-Zellkulturflasche $V(T25)$
- Das Materialvolumen einer T25-Zellkulturflasche $V(\text{Material})$

Für 15 Zellkulturflaschen im Behälter berechnen sich daraus die Gesamtvolumina:

- Das Gesamte am Gasaustausch beteiligte Volumen

$$V(\text{Gesamt}) = V(\text{Behälter}) - 15 * V(\text{Material})$$

- Das Innenvolumen von 15 Flasks

$$V(\text{Flasks}) = 15 * V(T25)$$

- Das Volumen der vollständig entfalteten Gaslunge ohne Berücksichtigung des Volumens der Flasks

$$V(\text{Gaslunge}) = V(\text{Gesamt}) - V(\text{Flasks})$$

Zusammenfassend kann folgende Formel aufgestellt werden:

$$c(\ddot{A}) = \frac{V(\text{Flasks}) * c(\text{Flasks}) + V(\text{Gaslunge}) * c(\text{Gasmischung})}{V(\text{Gesamt})}$$

Diese Formel gilt unter Optimalbedingungen, das heißt eine vollständige Entleerung jeglicher Luft aus der Gaslunge vor Anschluss der Druckflasche, und unter Gaszufluss vollständiger Entfaltung des Systems bis in alle Ecken des Acrylglasbehälters. Nicht als eigenes Volumen berücksichtigt wird außerdem der verbleibende Raum im gaszuführenden Schlauch sowie das Medium innerhalb der Zellkulturflaschen (sogenannter Totraum).

2.3 Validierung

Weil die Konzentration einiger Gase wie Xenon mit den verfügbaren Mitteln, insbesondere innerhalb der Zellkulturflasche, nicht direkt gemessen werden kann, muss unter Annahme eines vergleichbaren Verhaltens die Bewegung anderer Gase innerhalb des Aufbaus der zuvor beschriebenen Gasexpositionsmethode kontrolliert werden. Die erfolgte während der Entwicklung der Methode in Versuchsaufbauten

unter Verwendung des leichter entweichenden Sauerstoffs (für Dichtigkeitsprüfungen) oder des Xenon-ähnlicheren Kohlendioxids (für Diffusionsprüfungen) als Testgase.

2.3.1 Diffusion über die Mikroporenmembran

Die Mikroporen innerhalb der Teflon-Deckelmembran (Polytetrafluorethen) der Zellkulturflaschen werden vom Hersteller als gasdurchlässig mit einer Porenweite von $0,2 \mu\text{m}$ ($2 \times 10^{-7} \text{ m}$) beschrieben, genauere Angaben zum zugehörigen Diffusionsverhalten von Gasen konnten allerdings nicht genannt werden (Eigene Anfrage; M. Gabler, Corning Inc, 2019). Die Dauer des Diffusionsvorgangs ist relevant, weil erst nach ausreichender Diffusion über die Membran ein Äquilibrium erreicht ist und die in Abschnitt 2.2.2 beschriebene Formel geltend gemacht werden kann. Es wurde also eine eigene Messung in einem experimentellen Aufbau durchgeführt.

Ein luftdichter Behälter wurde mit einem Gaszufluss ausgestattet und eine T25-Zellkulturflasche mit Gasaustauschmembran im Inneren platziert. Der Messfühler eines Kohlendioxid-Messgerät (Vaisala GM70, Messbereich 0-5 % CO_2 , relative Messungengenauigkeit 1,5 % [74]) wurde über einen anderen, gasdicht versiegelten Zugang in diese Flasche eingeführt. Somit wurde nur CO_2 , das über die Membran in die T25 diffundiert war, von diesem erfasst. Nach Befüllen des Behälters mit einer 5% CO_2 -Gasmischung wurde der Zufluss abgeklemmt und der Anstieg der Kohlendioxid-Konzentration hinter der Mikroporen-Membran über 120 min dokumentiert. Daraufhin wurde der Behälter zur Raumluft hin geöffnet, sodass die CO_2 -angereicherte Atmosphäre aus der Zellkulturflasche entsprechend dem Konzentrationsgefälle in die Umgebung diffundierte. Der folgende Abfall der CO_2 -Konzentration wurde ebenfalls aufgezeichnet. Die Daten wurden mit Microsoft Excel (Microsoft Corp, Redmond, WA, US) graphisch dargestellt.



Abb. 5: Versuchsaufbau. Die obere T25-Zellkulturflasche im Bild ist mit dem Messfühler ausgestattet, unten mittig das CO_2 -Messgerät.

2.3.2 Dichtheitsprüfung der Gaslunge

Die aus Polyethylenfolie bestehende Gaslunge muss zumindest über die Dauer der Diffusion weitestgehende Luftdichtigkeit aufweisen, um ein Verfälschen der zuvor berechneten Äquilibriumkonzentrationen durch den Eintritt umgebender Raumluft in das geschlossene System zu vermeiden. Die Überprüfung der Gasdurchlässigkeit erfolgte in einem experimentellen Aufbau, als Messgröße diente die Konzentration elementaren Sauerstoffes.

Die Gasexposition wurde dafür wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben mithilfe der Gaslunge durchgeführt, allerdings anstelle der Zellkulturflaschen im Inneren ein tragbares Sauerstoffmessgerät platziert (GOX 100, Messbereich 0-100 %, absolute Messgenauigkeit 0,1 % O₂ [75]). Die Befüllung des Systems erfolgte daraufhin mit einer 100 % O₂-Gasmischung. Durch die transparente PE-Folie wurde die vom Gerät gemessene Sauerstoffkonzentration über 60 min in regelmäßigen Abständen abgelesen und gegen die Zeit aufgetragen. Die Datensammlung aus drei unabhängigen Wiederholungen des Experiments sowie eine Kurvenerstellung erfolgten mit Microsoft Excel.

2.3.3 Dichtheitsprüfung der verschlossenen Flaschen

Nach Abschluss von Gasexposition und Diffusionsvorgang sollte die neu zusammengesetzte Atmosphäre nicht unmittelbar aus den Zellkulturflaschen diffundieren, um eine verlängerte Wirkdauer an den Zellen zu ermöglichen. Da die Gase allerdings nach Öffnen der Gaslunge beginnen in die Raumluft zu diffundieren, muss dafür die Mikroporenmembran im Deckel der T25-Flasks ab diesem Zeitpunkt verschlossen werden. Für den gasdichten Verschluss wurden in dieser Arbeit eigens angefertigte Verschlusskappen aus Polyvinylchlorid (PVC), die zusätzlich mit Parafilm-Verschlussfolie überzogen wurden, eingesetzt. Um die Dichtigkeit dieser Methode nachzuweisen, erfolgte eine experimentelle Prüfung der Gasdurchlässigkeit über 24 Stunden.

Für den Versuch wurde der Messfühler des im Vorabschnitt beschriebenen Sauerstoffmessgeräts in eine T25-Zellkulturflasche eingebracht und der Sensor nach außen hin luftdicht versiegelt. Das Messgerät zeigte infolgedessen ausschließlich die O₂-Konzentration im Inneren der Zellkulturflasche an. Die Flasche wurde entdeckelt und über die Öffnung mit einer reinen O₂-Gasmischung befüllt, bis das Gerät eine Sauerstoffkonzentration von 100 % anzeigte. Daraufhin wurde die Flasche mit dem Deckel verschlossen und dessen Mikroporenmembran mit PVC-Kappe und Verschlussfolie abgedichtet. Über insgesamt 24 Stunden wurde danach in regelmäßigen Abständen der Messwert der Sauerstoffkonzentration vom Gerät abgelesen. Die Auswertung der Daten aus drei unabhängigen Wiederholungen sowie die graphische Darstellung erfolgten in Microsoft Excel.

2.3.4 Dosimetrie

Abschließend sollte untersucht werden, ob die Wechselwirkungen von ionisierender Strahlung mit xenonhaltigen Gasgemischen zu einer Änderung der Strahlendosis im Vergleich zur Raumluft führen. Die Dosimetrie erfolgte mit einer Ionisationskammer, diese wurde durch einen seitlichen Zugang in eine T25-Zellkulturflasche eingeführt. Die Graphitaußenschicht der Kammer wurde zusätzlich zum Lumen der Flasche hin mit einer Nitrilschicht gasdicht umhüllt.

Die mit der Ionisationskammer ausgestattete sowie zwei weitere T25-Flasks wurden mit 5ml Wasser zur Simulation eines Zellkulturmediums befüllt und eine Xenonexposition mithilfe der in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Methode und einer Gasmischung mit 75 % Xenonanteil durchgeführt, um eine Atmosphäre mit 50 % Xenonanteil in den Flasks zu erreichen. Diese Zielkonzentration wurde im Hinblick auf einen perspektivischen klinischen Einsatz gewählt, da es sich um eine subanästhetische Konzentration handelt. Um ein Entweichen der Xenonatmosphäre zu verhindern, erfolgte der gasdichte Verschluss der Zellkulturflaschen wie in Kapitel 2.2.3.3 erläutert. Anschließend wurde das Bestrahlungs-Setup wie unter 2.3.4 beschrieben und in den Abbildungen 6 und 7 gezeigt aufgebaut. Auf einer Seite des Setups wurde die Zellkulturflasche mit Xenonatmosphäre und Ionisationskammer platziert. Zur Berücksichtigung einer eventuellen verstärkten seitlichen Streustrahlung durch xenonhaltige Nachbarflaschen wurde auf beiden Seiten davon jeweils eine weitere T25-Flask mit Xenonatmosphäre angefügt. Das restliche Setup wurde mit 12 sogenannten *Dummies*, T25-Zellkulturflaschen befüllt mit 5ml Wasser und Raumluft, vervollständigt.

Für die anschließende Bestrahlung wurde ein Linearbeschleuniger (ELEKTA Synergy) der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsmedizin Mannheim verwendet. Das Gerät wurde auf die Abgabe von 180 Monitor Units (MU, entspricht der vom Linearbeschleuniger bei Bestrahlung gemessenen Dosisleistung, Angabe in $\text{cGy} = 10^{-2} \text{ Gy}$) Photonenstrahlung mit 6 MeV in einem $32 \times 32 \text{ cm}$ Strahlenfeld eingestellt. Die mittels Elektrometer in der Ionisationskammer gemessene Strahlendosis in Gray ($\text{Gy} = \text{J/kg}$) wurde in fünf Bestrahlungsvorgängen unter invarianten Geräteeinstellungen aufgezeichnet. Daraufhin wurden die drei Zellkulturflaschen mit Xenonatmosphäre aus dem Setup entnommen, geöffnet und die Atmosphäre mit Raumluft ausgewaschen. Anschließend wurden sie wieder auf dem vorherigen Platz im Setup platziert, mit identischen Einstellungen (180 MU, $32 \times 32 \text{ cm}$ Strahlenfeld) bestrahlt und die Strahlendosis in der Ionisationskammer unter Raumluftbedingungen in fünf weiteren Messungen aufgezeichnet. Die aufgezeichneten Daten wurden in Microsoft Excel verarbeitet.

Im Anschluss wurden unter Beibehaltung der Raumluftatmosphäre die für eine effektive Dosis von 2 Gy im Zielvolumen (Zellkulturflasche) benötigten MU mittels stufenweiser Variation der Geräteeinstellungen gemessen.

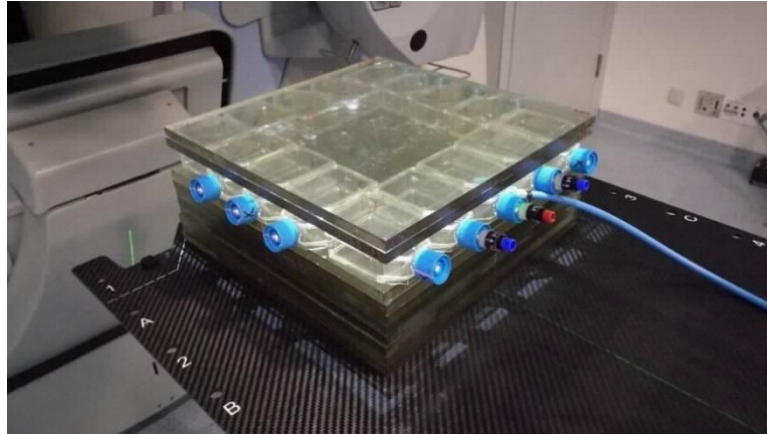


Abb. 6: Bestrahlungsansatz. Im Bild rechts der Mitte die Zellkulturflasche mit einliegender Ionisationskammer (rote Verschlusskappe), daneben zwei weitere Flasks mit xenonhaltiger Atmosphäre (blaue Verschlusskappen).

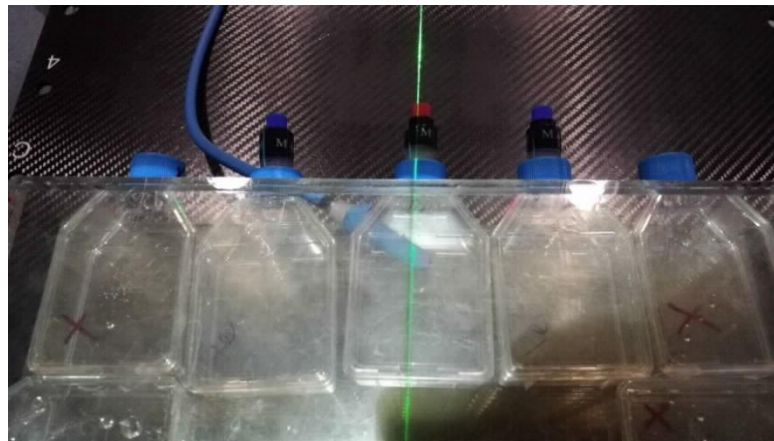


Abb. 7: Ionisationskammer in der Zellkulturflasche, Detailansicht. Die Graphitaußenschicht der Ionisationskammer ist gasdicht umhüllt.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Grundlagen

Der Bezug der Zelllinie erfolgte in kryokonservierter Form in flüssigem Stickstoff. Die Zellen wurden im 37° C warmen Wasserbad aufgetaut und mit 4 ml Medium in T25-Zellkulturflaschen gegeben. Als Medium diente DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FBS). Die Kultivierung erfolgte anschließend im Inkubator bei 37° C, 95 % Luftfeuchtigkeit in mit 5 % CO₂ angereicherter Raumluft.

Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig lichtmikroskopisch kontrolliert und beim Erreichen einer Konfluenz eine Passage durchgeführt. Dazu wurde das Medium aus der Flasche entfernt und die Zellen mit 3 ml Dulbecco's PBS (DPBS) gewaschen. Nach dem Waschen wurde das DPBS abpipettiert und die Zellen unter Zugabe von 1ml

Trypsin/EDTA, Verhältnis 1:3, für 5 min im Brutschrank inkubiert, wodurch es zu einer Ablösung der adhären Zellen von der Kulturoberfläche kommt. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der vollständigen Lösung (sog. Trypsinierung) wurden die Zellen in 4 ml Medium resuspendiert. Von dieser Lösung wurden 4,5 ml verworfen, der Rest mit 4,5 ml Medium wieder aufgefüllt und in den Inkubator verbracht. Damit ist rechnerische eine Verdünnung um den Faktor 10 erfolgt. Die Anzahl der Passagen wurde dokumentiert und die Zellkultur nach spätestens 10-15 Passagen verworfen, um Veränderungen am Geno- oder Phänotyp der Zellen vorzubeugen.

Gleichzeitig mit der ersten Passage erfolgte die Kryokonservierung von Zellen, die für spätere Versuche verwendet wurden. Dafür wurden die Zellen trypsinisiert und ausgezählt (siehe Abschnitt 2.3.2). Anschließend wurden die Zellen mit einem Einfriermedium bestehend aus 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), 20 % FBS und 70 % DMEM suspendiert, wobei das Verhältnis auf die Entstehung einer Lösung mit 10^6 Zellen/ml angepasst wurde. 1 ml (10^6 Zellen) dieser Lösung wurden daraufhin in ein Kryoröhrchen gegeben und zunächst auf -80°C abgekühlt, nach mindestens 4 Stunden erfolgte der Weitertransport in die flüssige Stickstoffkühlung.

2.4.2 Zählung

Für die Auszählung wurden die Zellen anfangs wie in 2.2.2 beschrieben trypsinisiert, und anschließend in 9ml Medium resuspendiert. In einem Eppendorf-Tube wurden daraufhin 10 μl dieser Suspension mit 10 μl Trypanblau vermischt und 10 μl der Mischung in eine Neubauer-Zählkammer mit Deckglas überführt. Es erfolgte die Auszählung der vier Eckquadrate, wobei nur vitale Zellen erfasst wurden, und anschließend die Bildung des Mittelwertes aus den vier Zählungen. Multipliziert mit dem Faktor 2 (Verdünnung durch Trypanblau) und 10^4 (Volumen der Zählkammer = 0,1 μl ; $0,1\ \mu\text{l} \times 10^4 = 1\ \text{ml}$) ergibt sich daraus die Zellzahl pro ml. Beispielsweise ergibt sich bei Auszählung von 156 Zellen in den 4 Eckquadranten:

$$\frac{156}{4} * 2 * 10.000 = 780.000\ \text{Zellen/ml}$$

2.4.3 Fixierung und Anfärbung

Die Fixierung wurde eingeleitet durch Abschütten des Mediums aus der Zellkulturflasche und Waschen der Zellen mit 5 ml DPBS. Nach Absaugen des DPBS erfolgte die Zugabe von 5 ml einer 3:1-Methanol/Essigsäure-Mischung. Nach 10-minütiger Lagerung war die Fixierung abgeschlossen und die Mischung wurde mit Wasser ausgewaschen.

Im Anschluss daran konnten die Zellen angefärbt werden. Hierfür wurden 5ml einer Kristallviolett-Lösung (1 g/l) als Färbemittel auf die fixierten Zellen gegeben und. Nach

10-minütiger Lagerung wurde das Kristallviolett mit Wasser ausgespült. Nachdem die Zellen vollständig getrocknet waren, konnte eine Koloniezählung erfolgen.

2.4.4 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellkulturen wurde an einem Linearbeschleuniger (LINAC) der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsmedizin Mannheim, durchgeführt. Der LINAC wurde auf die Abgabe von 181,2 Monitor Units (MU) Photonenstrahlung mit einer Energie von 6 MV in einem 32 x 32 cm Strahlenfeld eingestellt.

Acht 30 x 30 cm-PMMA-Platten von 1 cm Dicke wurden auf dem Bestrahlungstisch aufgebaut und die Zellen in T25-Zellkulturflaschen darauf entlang der Kanten platziert (vgl. Abb. 6-8). Für den Dosisaufbaueffekt wurden auf die Flaschen zwei weitere der PMMA-Platten gelegt. Die vertikale Einstellung zur Gantry erfolgte über Bewegung des Tisches bis die Deckelmembranen der Flaschen auf Höhe des Wandlasers lagen (100 cm Abstand zur Strahlenquelle, vgl. Abb. 8). Für die horizontale Einstellung wurde die Lichtmarkierung des Strahlenfelds geöffnet und der Plattenaufbau vollständig in das Lichtfeld geschoben.

Im klonogenen Überlebensassays wurden die Zellen in Gruppen entsprechend der effektiven Strahlendosis aufgeteilt. Für eine Dosisstaffelung in 0, 2, 4, 6 und 8 Gy wurden zunächst alle Gruppen im Setup platziert und anschließend die MU fraktioniert nach dem in Tabelle 1 beschriebenen Schema abgegeben. Zwischen den Einzeldosen wurden jeweils die Zellkulturflaschen mit bereits erreichter Zieldosis entnommen, für die restliche Bestrahlung im Vorraum des Linearbeschleunigers gelagert und durch Dummy-Flasks mit 5ml Wasserfüllung ersetzt. Die unbestrahlte Kontrollgruppe wurde ebenfalls im Setup aufgelegt, allerdings bereits vor der ersten Bestrahlung entnommen und ersetzt. Dadurch soll eine möglichst identische Behandlung aller Dosisgruppen garantiert werden.

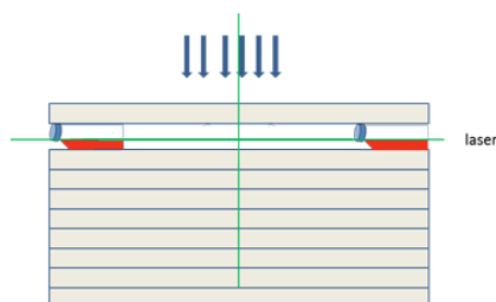


Abb. 8: Schematische Darstellung des Bestrahlungs-Setups abweichend mit einer PMMA-Platte (Quelle: Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsmedizin Mannheim)

Tab.1: Fraktionierung bei gleichzeitiger Bestrahlung mehrerer Dosisgruppen

Zieldosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
MU-Abgabe	-----	181,2 x 1	181,2 x 2	181,2 x 3	181,2 x 4

2.5 Klonogener Überlebensassay

2.5.1 Gruppen und Zellzahlen

Ziel des im Folgenden beschriebenen Versuches ist die Untersuchung des klonogenen Überlebens von Glioblastomzellen der Linie U87MG nach Bestrahlung mit bis zu 8 Gy unter Einfluss von Xenon und Memantin. Für den Versuch wurden zunächst vier Gruppen inklusive einer Kontrollgruppe festgelegt, die sich jeweils durch die Zugabe von Xenon und/ oder Memantin unterscheiden. Das Experiment mit allen Gruppen wurde daraufhin dreimal in voneinander unabhängigen Wiederholungen durchgeführt. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Gruppen:

Tab.2: Gruppen für klonogenen Überlebensassay

	A	B	C	D (Kontrolle)
Xenon	(+)	(+)	(-)	(-)
Memantin	(-)	(+)	(+)	(-)

Die Zellen wurden ca. 14-16 Stunden vor Bestrahlung wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben ausgezählt und mit DMEM auf Lösungen von 10^4 und 10^3 Zellen/ml verdünnt. Daraufhin wurden die Zellen nach dem in Tabelle 3 gezeigten Schema in T25-Zellkulturflaschen ausgesät, wobei die Zellzahl pro Flasche mit steigender Dosis erhöht wurde, um trotz des verminderten klonogenen Überlebens unter zunehmender Strahlendosis einen Zielwert von 0-200 Kolonien pro Flask zu erhalten. Von jeder Dosisgruppe wurden dabei drei Flaschen angesetzt, sodass insgesamt pro Gruppe (A, B, C, D) 15 Flaschen vorbereitet waren. Die Lagerung erfolgte anschließend über Nacht im CO₂-Inkubator bei 37° C und 5 % CO₂ und erlaubte den Zellen die Adhäsion an die Kulturoberfläche.

Tab.3: Zellzahlen pro Dosisgruppe

Dosis (Gy)	0	2	4	6	8
Zellzahl/Flask	1000	1000	2000	5000	10000

2.5.2 Vorbereitung

60 min vor Bestrahlung wurden die vorbereiteten 15 Flasks einer Gruppe aus dem Inkubator genommen und auf korrekte Adhäsion der Zellen überprüft. Daraufhin erfolgte je nach Gruppe die Zugabe einer Einheitsdosis von 25 µM Memantin (Gruppen B, C) oder destilliertem Wasser (ddH₂O) als Kontrolle (Gruppen A, D). Um eine Konzentration von 25 µM zu erreichen, muss rechnerisch die Zugabe von 108 µl einer 0,25 mg/ml Memantinhydrochloridlösung pro Flask erfolgen:

Konzentration Memantinhydrochlorid-Lösung	$c(\text{Lösung}) = 0,25 \text{ mg/ml}$
Zielkonzentration im Flask	$c(\text{Flask}) = 25 \text{ µM} = 25 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$
Volumen Flask	$V = 5 \text{ ml}$
Molare Masse Memantinhydrochlorid	$M \approx 216 \text{ g/mol}$

$$\frac{c(\text{Flask}) * M}{c(\text{Lösung})} * \frac{V}{1000 \text{ ml}} = 108 \text{ µl}$$

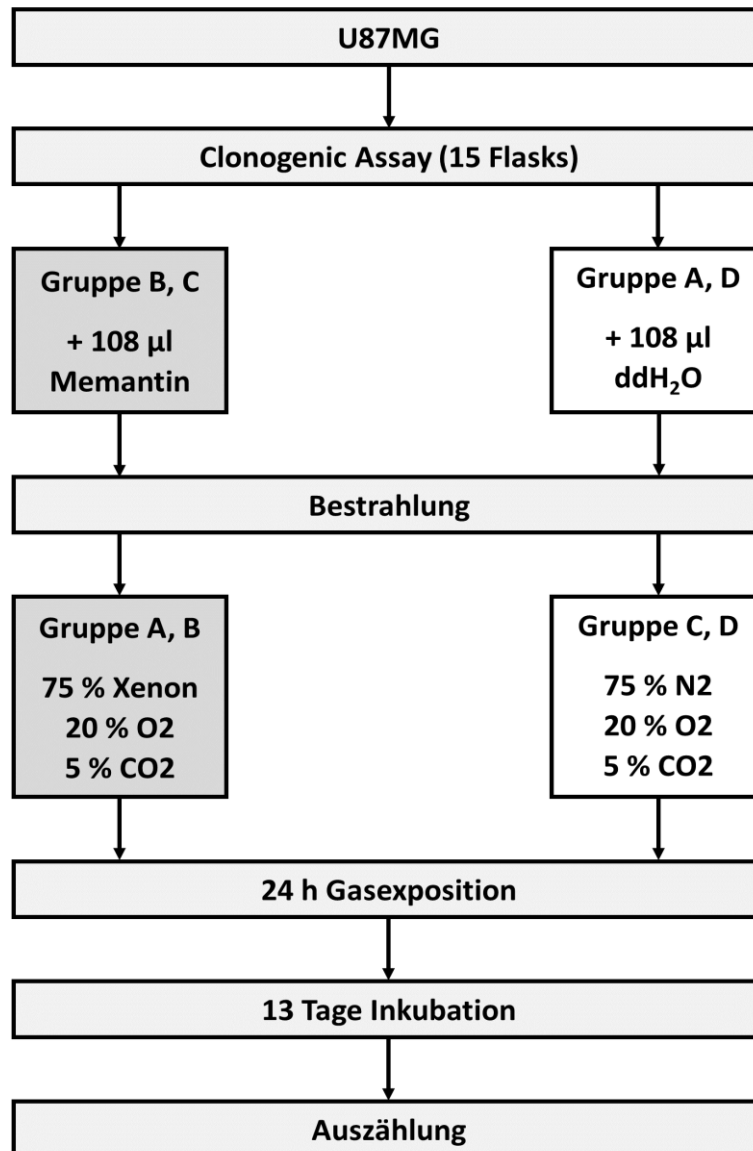
Nach Zugabe von 108 µl Memantin bzw. ddH₂O wurden die Flaschen erneut für eine Stunde im Inkubator gelagert, um nach der Manipulation einen CO₂-Konzentrationsanstieg auf 5 % in der Zellkulturflasche zu erlauben. Kurz vor der Bestrahlung wurden die Zellen dem Brutschrank entnommen und mit den in Abschnitt 2.2.3.3 beschriebenen PVC-Kappen verschlossen. Dies diente der Vorbeugung eines CO₂-Partialdruckabfalls und nachfolgendem pH-Anstiegs im Medium während des Bestrahlungsvorganges. Im Anschluss wurden die Zellen in einer verschlossenen und temperaturisolierten Transportbox zum LINAC überführt.

2.5.3 Bestrahlung und Gasexposition

In einem einzelnen Umlauf wurden alle 15 Zellkulturflaschen einer Gruppe (A, B, C, oder D) gleichzeitig behandelt. Diese 15 Flaschen beinhalten dabei 5 Dosisgruppen (0, 2, 4, 6, 8 Gy). Zunächst wurde das Bestrahlungs-Setup wie in 2.3.4 erläutert aufgebaut. Die drei Flaschen der Dosisgruppe 0 Gy wurden danach aus dem Aufbau entnommen und durch Dummy-Flasks ersetzt. Daraufhin folgte die erste Abgabe von 181,2 MU, anschließend Entnahme und Ersatz der 2 Gy-Flaschen sowie eine weitere Bestrahlung. Unter Fortführung dieses fraktionierten Schemas mit zwischenzeitlichem Flaschenaustausch wurden insgesamt 4 x 181,2 MU abgegeben. Die bereits entnommenen Zellkulturflaschen lagerten in der Transportbox im Vorraum des LINAC.

Im Anschluss an die Bestrahlung erfolgte unmittelbar die Gasexposition aller 15 Flasks mithilfe der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Methode. Die Reparatur der Doppelstrangbrüche nach der Bestrahlung sollte nun durch Zugabe von Xenon als

gasförmigen Glutamatrezeptorantagonisten inhibiert werden. Für die Xenonexposition der 15 Flasks in den Gruppen A oder B wurde dabei eine Gasmischung (I) verwendet, die aus 75 % Xenon, 20 % O₂ sowie 5 % CO₂ zusammengesetzt war, um eine Atmosphäre mit 50 % Xenonanteil in den Flasks zu erreichen. Für die 15 Flasks in den Gruppen C oder D wurde als Kontrolle eine Gasmischung (II) verwendet, die bei gleichen Sauerstoff- und Kohlendioxidanteilen zu 75 % aus Stickstoff (N₂) bestand. Die Gasmischung II entsprach somit der Zusammensetzung der Gasatmosphäre im CO₂-Inkubationsschrank.



Flussdiagramm 1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Pro Gruppe werden 15 Flasks bereitet, die dann geschlossen mit Memantin (Gruppen B, C) oder destilliertem Wasser (Gruppen A, D) behandelt werden bevor die Bestrahlung beginnt. Anschließend werden die 15 Flasks je nach Gruppe mit Xenongasmischung (Gruppen A, B) oder der Kontrollgasmischung (Gruppen C, D) behandelt.

2.5.4 Anschlussvorgehen

Nach Installation der spezifischen Gasexpositionsatmosphäre wurden die Zellen zunächst für 60 min innerhalb der Gaslunge belassen. In diesen Zeitraum konnten Diffusionsvorgänge über die Deckelmembranen der Zellkulturflaschen stattfinden. Die Konzentrationen der beteiligten Gase nach vollständiger Diffusion konnten mithilfe der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Formel berechnet werden. Zur Sicherstellung optimaler Bedingungen für die Zellkultur wurde der gesamte Expositionsbehälter während dieses Vorgangs in einem Wärmeschrank bei 37° C gelagert. Nach 60 min wurde die Gaslunge geöffnet, die Zellkulturflaschen entnommen und deren Deckelmembranen mit PVC-Kappen verschlossen. Für zusätzliche gasundurchlässige Abdichtung wurde über diese Kappen eine Parafilm-Verschlussfolie gespannt.

Dieser Verschluss wurde für die darauffolgenden 23 Stunden belassen und die Zellkulturflaschen währenddessen im Wärmeschrank bei 37° C gelagert. 24 Stunden nach Beginn der Gasexposition wurde dann der gasdichte Verschluss der Deckelmembranen geöffnet und die Atmosphäre konnte über 30 min aus den Flaschen diffundieren. Im Anschluss wurden die Zellen in den CO₂-Inkubator gebracht und über 13 Tage ohne weitere Manipulationen bei 37° C und Raumluft mit 5 % CO₂-Beimischung kultiviert. Anschließend, 14 Tage nach Bestrahlung, erfolgte dann die Fixierung und Färbung wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben.

2.5.5 Auswertung und Datenanalyse

Für die Auswertung wurden die Kolonien pro Zellkulturflasche ausgezählt. Als Kolonie wurden dabei Ansammlungen von mehr als 50 Zellklonen gewertet. Die ermittelten absoluten Zahlen können anschließend statistisch aufgearbeitet und analysiert werden. Folgende Werte wurden daraus ermittelt:

- *Plating Efficiency* (PE): Prozentualer Anteil koloniebildender Zellen an allen ausgesäten Zellen ohne Bestrahlung

$$PE = \frac{\text{Anzahl Kolonien}}{\text{Ausgesäte Zellen}} * 100$$

- *Surviving Fraction* (SF): Anteil koloniebildender Zellen an allen ausgesäten und bestrahlten Zellen, normalisiert auf die PE in der unbestrahlten Kontrollgruppe

$$SF = \frac{\text{Anzahl Kolonien}}{\text{Ausgesäte Zellen} * PE(D0)/100}$$

Diese Werte können mittels Linear-Quadratischem Modell (LQ-Modell) in dosisabhängige Überlebenskurven eingepasst werden. Das LQ-Modell basiert auf empirischen Beobachtungen, dass eine halblogarithmische Kurve des Zellüberlebens unter steigender Strahlendosis durch ein Polynom zweiten Grades dargestellt werden kann:

$$\ln[SF(D)] = -(\alpha * D + \beta * D^2)$$

D = Dosis [Gy], α = Zellspezifische Konstante [Gy^{-1}], β = Zellspezifische Konstante [Gy^{-2}]

Eine lineare und eine quadratische Komponente beschreiben den Kurvenverlauf, der sich unter geringer Anfangsdosis zunächst linear und unter steigender Strahlendosis zunehmend gekrümmt darstellt. Aus dieser Beobachtung lässt sich folgende Formel für das LQ-Modell ableiten:

$$SF(D) = e^{-(\alpha * D + \beta * D^2)}$$

Datensammlung und Berechnung von PE und SF erfolgten mittels Kalkulationstabelle in Microsoft Excel. Für die Anpassung der Überlebenskurven im LQ-Modell wurde das Programm Sigmaplot (Systat Software Inc, San Jose, CA, US) verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Gasexposition

3.1.1 Materialverbrauch und Handhabung

Für die Gasexposition von 15 Zellkulturflaschen einer Gruppe werden mit der Methode circa 2,3 - 2,5 l der jeweils verwendeten Gasmischung verbraucht. Weitere Verbrauchsmaterialien sind darüber hinaus ein PE-Folienbeutel und kleine Mengen Abdichtungsmaterial.

Die Konstruktion der Komponenten für die Methode konnte kostengünstig mithilfe von Materialien aus den Beständen der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie am Universitätsklinikum Mannheim erfolgen (Gesamtmaterialekosten <20,- €).

Unter Zugabe von 2,340 l Xenon-Gasmischung kann wie in Abschnitt 3.1.2 dargestellt rechnerisch eine Konzentration von >50 % Xenon in 15 Zellkulturflaschen erreicht werden. Bei einem Preis von 12,- € pro Liter (Eigene Rechnung, Air Liquide Deutschland GmbH) entstehen somit für die Exposition von 15 Zellkulturflaschen gegenüber einer Gasmischung mit 75 % Xenongehalt ca. 28,- € Kosten, wenn die geringen Beträge für Verbrauchsmaterialien wie den PE-Folienbeutel nicht berücksichtigt werden. Ein klonogener Überlebensassay mit 4 Gruppen und drei unabhängigen Wiederholungen kann entsprechend unter Anwendung von insgesamt ca. 28 l dieser Gasmischung durchgeführt werden. Bei Anwendung einer Kontroll-Gasmischung für 2/4 der Gruppen wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben sind es nur ca. 14 l, die im Zusammenhang mit der Xenonexposition entstehenden Gesamtkosten belaufen sich in diesem Fall auf ca. 170,- €.

In der Praxis liegt der Gasverbrauch nicht exakt bei diesem Wert, sondern kann sich unter Berücksichtigung einer nicht immer bestmöglichen Entfaltung der Gaslung sowie des Totraumes im Druckminderer und zuführenden Schlauchsystem um ca. 100-200 ml erhöhen, entsprechend entstehen für die experimentelle Xenonexposition in dieser Arbeit Materialekosten von etwa 180-190,- €.

Der Vorgang der Gasexposition kann von einer einzelnen Person bei geschätztem zeitlichem Aufwand von 5 – 10 min abgewickelt werden. Im Anschluss daran ist das geschlossene System ohne weitere Hilfsmittel mobil. Die Abmessungen erlauben die Aufbewahrung im Wärmeschrank in toto.

Trotz antibiotikafreiem Medium wurde im Zusammenhang mit der Gasexposition in keiner der insgesamt 180 T25-Zellkulturflaschen eine Kontamination beobachtet. Die Zellen zeigten in den Experimenten auch nach Anwendung der beschriebenen Methode Vitalität, mitotische Aktivität und Wachstum entsprechend den Erwartungen an eine Tumorzellkultur.

3.1.2 Gaskonzentrationen

Die Gaskonzentrationen nach abgeschlossener Exposition $c(\ddot{A})$ wurden mithilfe der in 2.2.2 beschriebenen Formel berechnet. Zunächst erfolgte die Bestimmung der erforderlichen Volumina. Aufgrund der Konstruktion bekannt ist:

$$V(\text{Behälter}) = 3780 \text{ ml}$$

Durch Verdrängungsmessungen in Wasser wurden festgelegt:

$$V(T25) = 71 \text{ ml}$$

$$V(\text{Material}) = 25 \text{ ml}$$

Dadurch ergibt sich:

$$V(\text{Flasks}) = 15 * 71 \text{ ml} = 1065 \text{ ml}$$

$$V(\text{Gesamt}) = 3780 \text{ ml} - 375 \text{ ml} = 3405 \text{ ml}$$

$$V(\text{Gaslunge}) = 3405 \text{ ml} - 1065 \text{ ml} = 2340 \text{ ml}$$

Die Gaskonzentrationen der Gasmischungen $c(\text{Gasmischung})$ sind für (I) und (II) in Tabelle 4 dargestellt. Die initialen Gaskonzentrationen in der Zellkulturflaschen bei verschlossenem Transport aus dem CO₂-Inkubator sind als $c(\text{Flask})$ aufgeführt.

Tab. 4: Gaskonzentrationen vor Exposition

	$c(\text{Gasmischung I})$	$c(\text{Gasmischung II})$	$c(\text{Flask})$
Xenon	75 %	0 %	~ 0 %
CO ₂	5 %	5 %	~ 5 %
O ₂	20 %	20 %	~ 20 %
N ₂	0 %	75 %	~ 75 %

Nach Einsetzen aller Variablen in die Formel

$$c(\ddot{A}) = \frac{V(\text{Flasks}) * c(\text{Flasks}) + V(\text{Gaslunge}) * c(\text{Gasmischung})}{V(\text{Gesamt})}$$

ergibt sich für $c(\ddot{A})$ in Abhängigkeit von der verwendeten Gasmischung:

Tab.5: Gaskonzentrationen nach Exposition

	Gasmischung (I)	Gasmischung (II)
Xenon	~ 51,54 %	~ 0 %
CO ₂	~ 5 %	~ 5 %
O ₂	~ 20 %	~ 20 %
N ₂	~ 23,46 %	~ 75 %

Rechnerisch kann also, bei Verwendung von Gasmischung (I) für die Gasexposition, innerhalb der Zellkulturflaschen eine Xenonkonzentration von >50 % erreicht werden. Bei der Verwendung von Gasmischung (II) als Kontrolle ändert sich dagegen die Zusammensetzung der Atmosphäre nicht relevant.

3.2 Validierung

3.2.1 Diffusion über die Mikroporenmembran

Abbildung 9 zeigt die erhobenen Messwerte für die Kohlendioxidkonzentration innerhalb der Zellkulturflasche im zeitlichen Verlauf unter den in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Bedingungen. Der Startwert lag bei 0,158 % - entsprechend einem normalen atmosphärischen CO₂-Anteil im Innenraumbereich [76]. Nach einer Diffusionsdauer von 60 min wurde eine CO₂-Konzentration von 3,249 % gemessen. Die folgenden 60 min schwankten die Messwerte zwischen 3,20 und 3,30 %, nach insgesamt 120 min lag der Wert bei 3,284 %. Abbildung 10 stellt die minütlich erhobene relative Änderung der CO₂-Konzentration im Vergleich zum Vorwert dar. Positive Werte bedeuten dabei eine Einwärtsdiffusion, negative eine Auswärtsdiffusion.

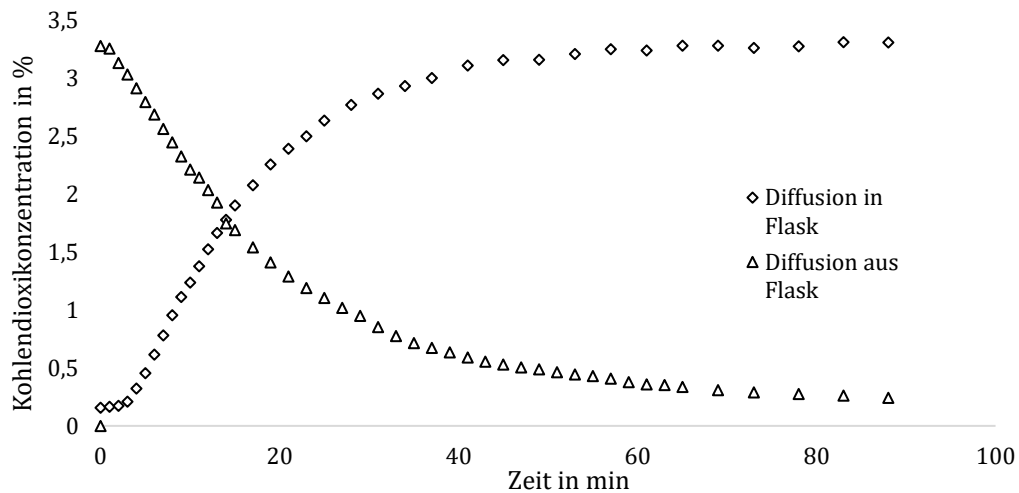


Abb. 9: Messwerte der CO₂-Konzentration im Inneren der Zellkulturflasche im zeitlichen Verlauf. *Diffusion in Flask* beschreibt den Verlauf nach Installation einer 5 %-CO₂-Atmosphäre auf der anderen Seite der Mikroporenmembran. Die Werte für *Diffusion aus Flask* stellen den Abfall der erreichten CO₂-Konzentration über die Membran dar.

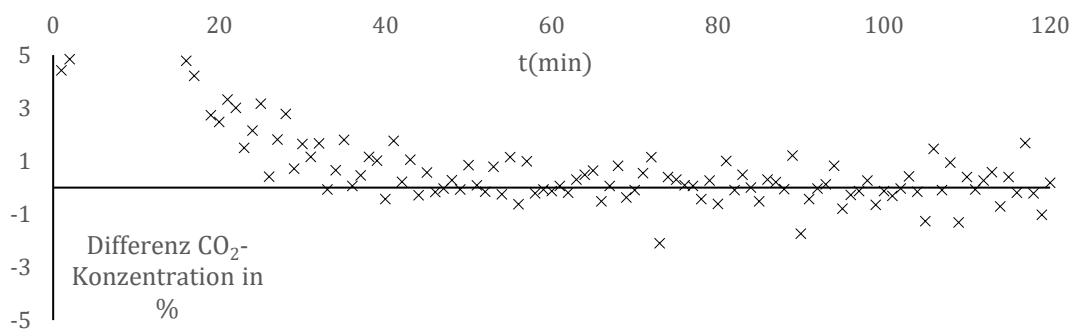


Abb. 10: Relative Differenz der Messwerte für *Diffusion in Flask* zum Vorwert. Ab etwa t=60 min kommt es netto zu keiner relevanten Gasverschiebung über die Membran.

Wie in Abbildung 10 dargestellt hält sich die Anzahl positiver und negative Werte ab etwa t = 45 min die Waage. Unter Einbeziehung der relativen Ungenauigkeit der Messtechnik von 1,5 % kommt es 45 min nach Gasexposition damit zu keiner weiteren relevanten CO₂-Konzentrationsänderung.

3.2.2 Dichtheitsprüfung der Gaslunge

Abbildung 11 stellt die Messwerte der Sauerstoffkonzentration in der mit 100 % O₂ befüllten Gaslunge über 60 min dar. Die Messbedingungen sind in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Als Startwert wurden 100 %, gemessen, nach 60 min konnte im Mittel noch eine O₂-Konzentration von 96,8 % festgestellt werden.

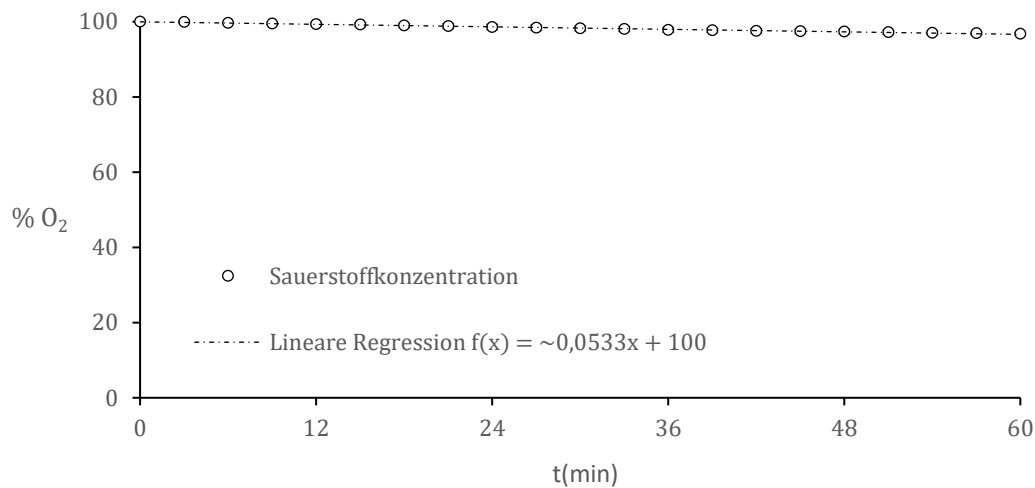


Abb. 11: Mittelwert der Sauerstoffkonzentration innerhalb der Gaslunge über 60 min. Die Fehlerindikatoren markieren die doppelte Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen.

Eine lineare Regressionsgerade kann den Kurvenverlauf näherungsweise beschreiben, aus dem Steigungswert lässt sich ein durchschnittlicher Abfall der Gaskonzentration innerhalb der Gaslunge von ca. 0,0533 % pro Minute ablesen, das entspricht ca. 0,0667 % des Partialdruckgefälles zur Raumluft. Diese entspricht den erwarteten Verlusten innerhalb der Toleranz (< 5 %/h)

3.2.3 Dichtheitsprüfung der verschlossenen Flaschen

Abbildung 12 zeigt den Messwertverlauf der Sauerstoffkonzentration innerhalb der wie im Abschnitt 2.3.3 beschrieben mit 100 % O₂ befüllten und anschließend mittels PVC-Kappen und Verschlussfolie abgedichteten T25-Flasks. Der Startwert lag bei 100 %, nach 24 Stunden konnte im Mittel noch eine O₂-Konzentration von 93.13 %, 95 % KI [92,71; 93.55 %] gemessen werden. Der Konzentrationsverlauf kann durch eine lineare Regressionsanalyse angenähert werden. Aus der Steigung der Geraden lässt sich ablesen, dass die O₂-Konzentration in den verschlossenen Flasks pro Stunde um ca. 0,3 % abfällt. Unter Berücksichtigung einer Konzentration von ~ 20 % O₂ in der umgebenden Raumluft kann dieser Messwert auch als stündlicher Abfall um etwa 0,375 % des Konzentrations- bzw. Partialdruckgefälles interpretiert werden. Diese entspricht den erwarteten Verlusten innerhalb der Toleranz (< 0,5 %/h)

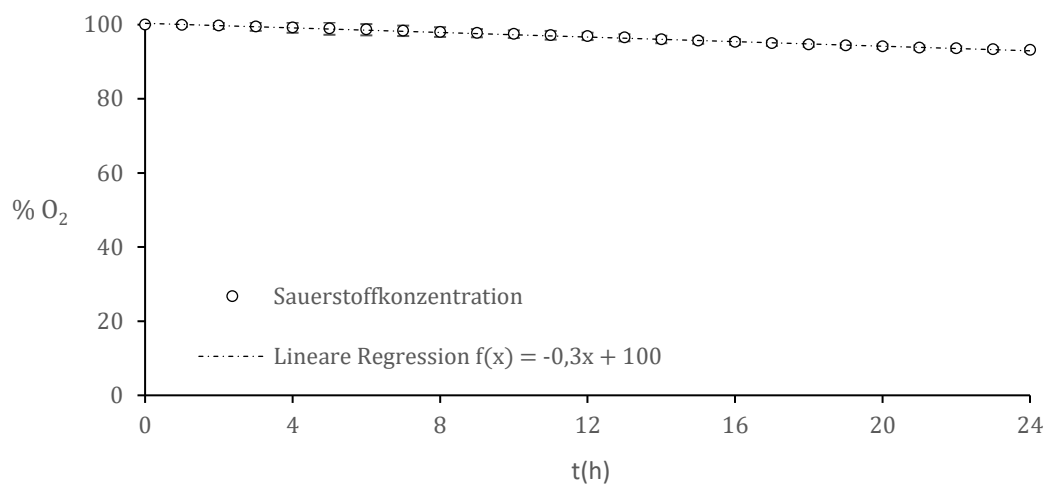


Abb. 12: Mittelwert der Sauerstoffkonzentration innerhalb der verschlossenen Flaschen über 24 Stunden. Die Fehlerindikatoren entsprechen der doppelten Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen.

3.2.4 Dosimetrie

Die Strahlendosis innerhalb der Zellkulturflasche bei geräteseitiger Abgabe von 180 MU und Verwendung des in Kapitel 2.3.4 beschriebenen Bestrahlungs-Setups wurde in fünf aufeinanderfolgenden Messungen ermittelt. Als Messbedingungen wurde ein Luftdruck von 1016 hPa bei einer Temperatur von 25° C gemessen. Die Ergebnisse sind für Xenonatmosphäre und Raumluftatmosphäre in Tabelle 6 dargestellt, die Einheit mGy entspricht 10^{-3} Gy.

Tab. 6: Effektive Strahlendosis in der Zellkulturflasche bei Bestrahlung einer Xenonatmosphäre im Vergleich zu einer Raumluftatmosphäre.

	Xenonatmosphäre	Raumluftatmosphäre
Dosis (Mittelwert)	2022 mGy	1993 mGy
Standardabweichung	0,707 mGy	1,225 mGy
Varianz	0,5 mGy	1,5 mGy
95% Konfidenzintervall	[2020,6; 2023,4 mGy]	[1990,5; 1995,4 mGy]

Der Xenongehalt in der Atmosphäre führt damit zu einer Erhöhung der Strahlendosis um 29 mGy [95 % KI 25,2; 32,9 mGy] im Vergleich zur Raumluft. Die Messwerte zeigten eine geringe Varianz im Bereich weniger mGy und insgesamt im Student's t-Test (ungepaart, zweiseitig) eine hochsignifikante Abweichung ($p < 0,0001$) der Strahlendosis abhängig von der atmosphärischen Zusammensetzung.

In den weiteren Probemessungen unter Raumluftatmosphäre ergab sich für eine effektive Strahlendosis von 2 Gy im Zielvolumen unter Verwendung dieses Setups die geräteseitige Einstellung auf 181,2 MU.

3.3 Klonogener Überlebensassay

3.3.1 Plating Efficiency

Die berechneten Werte für die Plating Efficiency (PE) sind als Mittelwert aus den drei unabhängigen Experimenten für die Gruppen A – D in Abbildung 13 graphisch dargestellt.

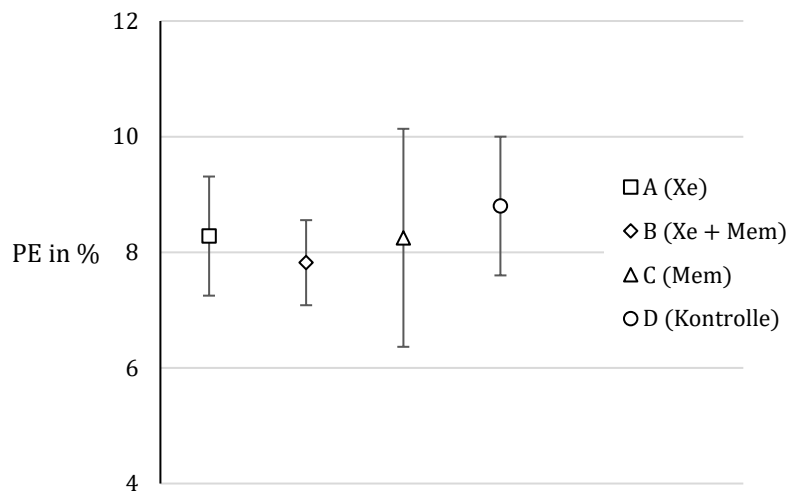


Abb. 13: Mittelwert der Plating Efficiency in den Gruppen A-D im Vergleich. Die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall von zwei Standardabweichungen.

Die höchste Plating Efficiency wurde in der Kontrollgruppe mit 8,80 %; 95 % KI [7,60, 10,0 %] beobachtet. Die PE der mit Xenon behandelten Zellen (8,28 %; 95 % KI [9,31, 7,25 %]) ist vergleichbar mit der PE unter Memantinzugabe (8,25 %; 95 % KI [10,14, 6,35 %]). Die niedrigsten Werte zeigten sich in der mit beiden Substanzen behandelten Gruppe mit einer PE von 7,82 %; 95 % KI [7,08, 8,56 %]. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Gruppen konnten im Student's-t-Test (ungepaart, zweiseitig) nicht festgestellt werden (A: $p = 0,3262$, B: $p = 0,0728$, C: $p = 0,4463$).

3.3.2 Surviving Fraction

Die berechneten Werte für die Surviving Fraction sind als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten für die Gruppen A - D in Tabelle 7 dargestellt. Die SF der unbestrahlten Kontrollgruppe SF_{D0} nimmt hierbei immer den Wert 1 an.

Tab. 7: Mittelwert der Surviving Fraction in den Gruppen A – D in Abhängigkeit von der Strahlendosis. In Klammern ist das 95 %-Konfidenzintervall von zwei Standardabweichungen angegeben. (*) = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. Berechnung mittels ungepaartem, zweiseitigen Student's t-Test unter Annahme gleicher Varianz.

	A (Xe)	B (Xe + Mem)	C (Mem)	D (Kontrolle)
0 Gy	0,924 [0,883; 1,01]	0,889 [0,856; 0,923]	0,936 [0,851; 1,029]	1,000 [1,000; 1,000]
2 Gy	0,411 [0,354; 0,478]	0,298* [0,260; 0,341]	0,457 [0,376; 0,556]	0,504 [0,470; 0,540]
4 Gy	0,250* [0,236; 0,266]	0,178* [0,164; 0,193]	0,275 [0,219; 0,345]	0,318 [0,308; 0,329]
6 Gy	0,102* [0,089; 0,116]	0,094* [0,083; 0,106]	0,152 [0,118; 0,196]	0,179 [0,168; 0,192]
8 Gy	0,046* [0,043; 0,050]	0,039* [0,035; 0,043]	0,078 [0,064; 0,095]	0,093 [0,081; 0,107]

Signifikante Unterschiede der Surviving Fraction im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich für die Kombination von Xenonexposition und Memantinzugabe in allen ≥ 2 Gy bestrahlten Dosisgruppen. Die SF in der Gruppe B bei einer Dosis von 8 Gy beträgt ca. 41 % des Wertes für die SF in der Kontrollgruppe. Xenonexposition ohne Memantinzugabe führte bei Einzeldosen ≥ 4 Gy zu einer signifikanten Minderung der Surviving Fraction. Memantin allein reduzierte die SF gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls, allerdings konnte dabei keine statistische Signifikanz festgestellt werden.

Für die xenonbehandelte Gruppe A sowie die mit Xenon und Memantin behandelte Gruppe B konnte außerdem bei einer Dosis von 8 Gy eine signifikante Minderung der Surviving Fraction im Vergleich zu der mit Memantin allein behandelten Gruppe C gezeigt werden ($p = 0,045$ bzw. $p = 0,025$).

Bei einer Dosis von 2 Gy war die SF der Gruppe B zudem gegenüber der Gruppe A signifikant vermindert ($p = 0,024$). Ansonsten ergaben sich zwischen den Gruppen A und B keine signifikanten Differenzen.

3.3.3 Linear-Quadratisches Modell

Für das Linear-Quadratische Modell wurde die Surviving Fraction der Gruppen A - D in einer Variante auf die $SF_{D0} = 1$ normalisiert (Abbildung 14), in der anderen auf die Surviving Fraction der jeweiligen unbestrahlten Dosisgruppe ($SF_{A0-D0} = 1$) (Abbildung 15). Die linear-quadratischen Kurven wurden daraufhin durch das Programm Sigmaplot berechnet und eingefügt.

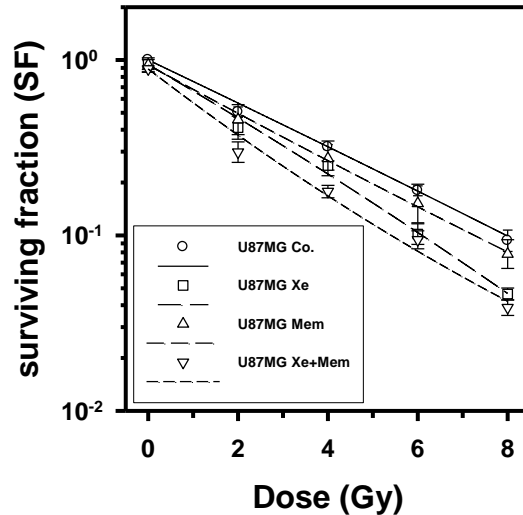


Abb. 14: LQ-Modell des Mittelwerts der dosisabhängigen SF in den Gruppen A - D in halblogarithmischer Darstellung, normalisiert auf SF_{D0} . Die Fehlerbalken markieren das 95 % Konfidenzintervall von zwei Standardabweichungen.

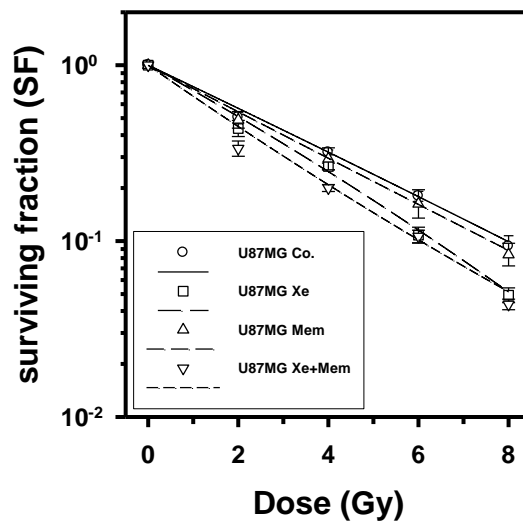


Abb. 15: LQ-Modell des Mittelwerts der dosisabhängigen SF in den Gruppen A - D in halblogarithmischer Darstellung, normalisiert auf $SF_{A0-D0} = 1$. Die Fehlerbalken markieren das 95 %-Konfidenzintervall von zwei Standardabweichungen.

Aus den linear-quadratischen Kurven, die vom Programm berechnet werden, lassen sich die α und β -Werte bestimmen. Diese beschreiben die intrinsische zellspezifische Reaktion auf die Bestrahlung abhängig von der Dosis. Während der α -Wert einen linearen Kurvenverlauf (üblicherweise im Bereich geringerer Dosen) beschreibt, dient der β -Wert der Darstellung eines gekrümmten Graphen (eher im Hochdosisbereich). Aus den im LQ-Modell berechneten Kurven in Abbildung 15 wurden also über die Gleichung

$$SF(D) = e^{-(\alpha \cdot D + \beta \cdot D^2)}$$

mithilfe von Sigmaplot die Werte für α und β in den Gruppen A – D bestimmt. Diese sind mit der entsprechenden α/β -Ratio in Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8: Ermittelte α - und β -Werte sowie α/β -Ratio in den Gruppen A - D im Vergleich.

	A (Xe)	B (Xe + Mem)	C (Mem)	D (Kontrolle)
α (Gy ⁻¹)	0,3257	0,4119	0,3063	0,2806
β (Gy ⁻²)	-0,0057	0,0051	0,0004	0,0010
α/β (Gy)	-57.14	80.76	765.75	280.60

4 DISKUSSION

4.1 Methodische Qualität

Zur Etablierung der Methodik musste gezeigt werden, dass die an sie gestellten spezifischen Anforderungen erfüllt werden. In der vorliegenden Arbeit war die Hauptzielsetzung die Xenonexposition von Zellkulturen, weitere Anforderungen werden in Kapitel 1.4 beschrieben. Im Folgenden wird deren Erfüllung mithilfe der zuvor präsentierten Ergebnisse diskutiert.

4.1.1 Materialbedingte Handhabung

Die Methode zur Xenonexposition von Zellkulturen ist wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben leicht zu bedienen und bindet geringe personelle Ressourcen. Die Methode erfüllt die Anforderungen der Zellkultur dahingehend, dass eine Gasexposition vitaler Zellen problemlos möglich ist und anschließend weiterhin ein koloniebildendes Wachstum möglich ist, ohne dass eine erhöhte Kontaminationsrate auftritt.

Das mobile Design erlaubt den Transport bis an den LINAC und somit die Gasexposition von bis zu 15 Zellkulturflaschen unmittelbar vor oder nach Bestrahlung, insgesamt können beide Arbeitsschritte zusammen innerhalb von ca. 15-20 min abgeschlossen werden. Die Gasexposition kann somit in zeitlich engem Zusammenhang zur Bestrahlung erfolgen. Da DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) in der Zelllinie U87MG schon innerhalb weniger Stunden nach Bestrahlung um mehr als die Hälfte zurückgegangen sind, erscheint eine frühzeitige Gasexposition im Hinblick auf maximale Wirksamkeit der DSB-Reparaturinhibition sinnvoll [77, 78].

Im Rahmen der wiederholten Anwendung der Methode war die in Abschnitt 2.2.1 beschriebene Entfaltung der Gaslung innerhalb des geschlossenen Behälters durch zufälligen Faltenwurf der PE-Folie und ausgesparte Ecken nicht akribisch genau reproduzierbar. Durch optische Kontrollen wurden diese Variationen als minimale Abweichungen ohne relevante Auswirkung auf Gasvolumina und -konzentrationen beurteilt, es handelt sich jedoch zusammenfassend um eine materialbedingte Schwäche der exakten Reproduzierbarkeit. Einen Ansatzpunkt zur Verbesserung stellt hier die Anwendung eines größeren Gesamtvolumens dar, was wiederum mit der Zielsetzung der Wirtschaftlichkeit konkurriert.

4.1.2 Wirtschaftlichkeit

Die Methode erlaubt den wirtschaftlichen Einsatz von Xenon an der Zellkultur. Die Kostenaufstellung unter 3.1.2 ergibt einen Einsatz von 14 Litern Xenon für den klonogenen Assay, somit ist der Materialaufwand beim Gasverbrauch im Vergleich zu Alternativmethoden deutlich reduziert (s. Abschnitt 4.1.5).

4.1.3 Validität

4.1.3.1 Gaskonzentrationen

Die Validierung der Methode erfolgte zunächst über Gasbewegungsmessungen, die das Verhalten von problemlos messbaren *Tracer-Gasen* in den Teilschritten des Expositions- und anschließenden Lagerungsvorganges demonstrierten. Unter der Voraussetzung gleicher Bedingungen sowie Berücksichtigung der unterschiedlichen, wenngleich möglichst kongruenten, physikalischen Parameter können diese Ergebnisse auf das Verhalten von anderen Gasen übertragen werden [79, 80].

Gemäß dem ersten Fick'schen Gesetz ist die Diffusionsrate abhängig von Konzentrationsgradient sowie dem Diffusionskoeffizienten. Nach der Chapman-Enskog-Theorie ist der Diffusionskoeffizient bei der Diffusion eines Gases in das andere bei gleichen Temperatur- und Druckbedingungen umgekehrt proportional zu folgenden Werten [81]:

- Wurzel der Summe der molaren Massen M beider beteiligter Gase
- Quadrat des mittleren Kollisionsdurchmessers σ beider beteiligter Gasmischungen
- Kollisionsintegral Ω , proportional zum Verhältnis des Lennard-Jones-Potentials zur Boltzmann-Konstante ϵ/k_B

Tab. 9: Physikalische Parameter für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gase nach Cussler, 2009 [81]

		Xe	CO ₂	O ₂	Raumluft
M	[g/mol]	131,1	44,01	31,99	28,95
σ	[Å = 10 ⁻¹⁰ m]	4,047	3,941	3,467	3,711
ϵ/k_B	[K]	231,0	195,2	106,7	78,6

Xenon ist also bei deutlich größerer molarer Masse in den Größen σ und ϵ/k_B mit dem Molekül CO₂ vergleichbar. Die Mikroporen mit einem Durchmesser von 2×10^{-7} m können von Xenon mit $\sigma = 4,047 \times 10^{-10}$ m problemlos durchquert werden. Als Näherungswert für die Diffusion von Xenon über die mikroporöse Membran der Zellkulturflaschen in eine Raumluftatmosphäre wurden daher die Messwerte der CO₂-Konzentrationsänderung (in Kapitel 3.1.3 dargestellt) als ausreichend beurteilt und ein ähnliches Verhalten angenommen. Publikationen aus dem Bereich der Geochemie beschreiben eine umgekehrte Variante, hierbei wird die Bewegung von CO₂ mithilfe eines radioaktiven Xenon-Tracers verfolgt [82, 83]. Die Verbreitung des Verfahrens impliziert eine Vergleichbarkeit der Gase in ihrem Diffusionsverhalten.

Gemäß der Chapman-Enskog-Theorie wird die Diffusionsgeschwindigkeit für Xenon mit den vorliegenden CO₂-Daten jedoch geringfügig unterschätzt, da das Edelgas in allen relevanten Parametern höhere Werte aufweist (vgl. Tabelle 9). Da die CO₂-Diffusion nach ca. 45 min abgeschlossen war, wurde für die Versuche an der Zellkultur die Xenonexposition um ein Drittel verlängert und die Inkubationsdauer in der Gaslunge auf 60 min festgelegt. Nach diesem Zeitraum wird die in Kapitel 2.2.2 gezeigte Formel für $c(\text{Å})$ geltend gemacht, nach den Berechnungen aus Abschnitt 3.1.2 kann damit eine Konzentration von 51,54 % Xenon an der Zellkultur erreicht werden.

Neben dem ausreichenden Diffusionszeitraum ist Voraussetzung für die Gültigkeit der Formel für $c(\text{Å})$ auch eine optimale Entfaltung der Gaslunge innerhalb des Behälters. Da letztere geringen Schwankungen unterliegt (vgl. Abschnitt 4.1.1) ist die rechnerische Xe-Konzentration über der Zielkonzentration von 50 % gewählt worden. Mithilfe der Formel berechnet sich, dass für eine Konzentration von >50 % Xe in den Flasks das Volumen der Gaslunge $V(\text{Gaslunge})$ um bis zu 210 ml verkleinert sein kann. In der Praxis kann deswegen trotz methodisch bedingter Schwankungen und Verluste von einem Erreichen der Zielkonzentration ausgegangen werden.

Um die berechneten Werte für $c(\text{Å})$ weiterzuverwenden, muss weiterhin der Nachweis erfolgen, dass die für Xenonexposition verwendeten Materialien eine ausreichende Dichtigkeit aufweisen. Diese wird durch folgende physikalische Vorgänge beeinflusst [84]:

- **Diffusion** in die umgebende Raumluft durch Öffnungen mit Durchmesser $> \lambda$ ($\lambda =$ *mittlere freie Weglänge* der Atome im gasförmigen Zustand), Diffusionsrate abhängig von Konzentrationsgradienten und Diffusionskoeffizienten [84].
- **Effusion** durch das Molekulargitter des Festkörpers oder Mikroöffnungen mit einem Durchmesser $< \lambda$, Effusionsrate nach Graham'schen Effusionsgesetz proportional zur Quadratwurzel der molaren Masse [84].

Es muss bei der Verwendung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methodik von beiden Vorgängen ausgegangen werden. Bei der Gasexposition über 60 min sowie während der Lagerung der verschlossenen Zellkulturflaschen über 23 Stunden finden Diffusion und Effusion in die umgebende Raumluft statt, eine absolute Dichtigkeit ist physikalisch nie gegeben [85].

Die entsprechenden Messungen wurden wie in Kapitel 2.3.2 und 2.3.3 beschrieben mit Sauerstoff durchgeführt. Die Methode der Dichtheitsprüfung mithilfe eines kleineren und leichter messbaren *Tracer-Gases* ist aus der industriellen Anwendung bekannt und etabliert [79]. Für O₂ berechnet sich im Vergleich zu Xenon mithilfe der in Tabelle 9 aufgeführten Werte ein deutlich höherer Diffusionskoeffizient, beim Vergleich

der molaren Massen kann außerdem von einer vergleichsweise höheren Effusionsrate ausgegangen werden.

Die Annahme eines ähnlichen Verhaltens der beiden Gase wurde deswegen dahingehend erweitert, dass ein Abfall der Sauerstoffkonzentration aufgrund der besseren Diffusion und Effusion sogar stärker ausfällt als der eines größeren Gases wie Xenon. Im Umkehrschluss unterschätzt also das relative Absinken der Sauerstoffkonzentration mit zunehmender Expositionsdauer die relative Xenonkonzentration.

Die Ergebnisse der Dichtheitsprüfung von Gaslunge und Zellkulturflaschen für Sauerstoff können also auf größere, schwerere und dichtere Gase wie Xenon oder CO₂ ($\lambda_{\text{CO}_2} = 4,0 \times 10^{-10}$ m unter Standardbedingungen) übertragen werden und stellen einen Mindestwert der Dichtigkeit dar [85]. In der Praxis kommt es bei der Xenonexposition unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Kapiteln 3.2.2 sowie 3.2.3 in konservativer Annahme einer gleichen Effusionsrate von Xenon und O₂ also zu folgenden Werten:

Rechnerische Xenonkonzentration bei Exposition wie in 2.2.1 beschrieben	>50,0 %
Relativer Konzentrationsverlust während 60 min Exposition:	<4,0 %
Relativer Konzentrationsverlust während 23 h Lagerung:	<8,6 %
<u>Mindestwert</u> für die Xenonkonzentration an der Zellkultur über 24 h	43,7 %

Die Dichtheitsprüfung zeigt auch, dass über 24 Stunden ein nahezu gleichbleibender Xenoneinfluss gegeben ist, sowie dass die von der Zellkultur benötigte CO₂-Konzentration von 5 % über diesen Zeitraum weitestgehend stabil bleibt. Ein Abfall des CO₂-Partialdruckes hätte eine pH-Verschiebung im Medium zur Folge, deren Auswirkungen auf den Metabolismus der U87MG-Zellen das Wachstum beeinflussen kann [86]. Nach Ausschluss eines relevanten CO₂ Abfalls erfolgte ein Verschluss der Zellkulturflaschen über 24 h, um eine Gasexposition über den gesamten Zeitraum der Reparatur strahlungsinduzierter Doppelstrangbrüche zu ermöglichen [77].

4.1.3.2 Dosimetrie

Die Dosimetrie einer Xenonatmosphäre im Vergleich zur Raumluftatmosphäre zeigte einen dosisverstärkenden Effekt des Edelgases, wie in der Literatur bereits postuliert und unter ungleichen Bedingungen quantifiziert [87]. Grundlage ist die vermehrte Photoionisation unter Strahlungseinfluss an schweren Atomen wie Xenon [87, 88]. Bekannt und nutzbar gemacht wird dieser Effekt auch bei der Verwendung von Xenon als Füllgas für Ionisationskammern: Im Vergleich zu raumluftgefüllten Modellen erhöht

sich dabei die Nachweiswahrscheinlichkeit ionisierender Strahlung [89]. Dieser Zusammenhang lässt sich über physikalische Parameter erklären.

Gasförmiges Xenon ist im Vergleich zur Erdatmosphäre unter Standardbedingungen ca. 4,5-mal dichter (5,897 vs. 1,292 kg/m³), und der Abstand zwischen den Atomen liegt bei 1000 hPa Druck mit einer mittleren freien Weglänge von $\lambda_{Xe} = 3,6 \times 10^{-8}$ m unter dem in Luft ($\lambda_{Luft} = 6,7 \times 10^{-8}$ m) [85, 90]. Die Xenon-Atome sind außerdem größer als die Moleküle der Raumluft (vgl. Tabelle 9). Bei der Verwendung von Photonen zur Bestrahlung einer xenonreichen Atmosphäre hat dieser Umstand den Effekt, dass sich die Wechselwirkungswahrscheinlichkeit erhöht: Ein Xenon-Atom stellt ein größeres Ziel (*Target*) für die ankommenden Photonen dar, aufgrund der erhöhten Dichte liegen die Atome in einer Xenonatmosphäre zudem näher zusammen und bilden ein größeres Gesamt-Target. Folge der Photon-Atom-Wechselwirkungen sind Streuung, Anregung und Ionisation [91].

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Dosimetrie zeigte sich abhängig von Xenon- oder Raumluftbedingungen ein signifikanter Unterschied der Messwerte. Da zwischen den Messungen bis auf den Atmosphärenwechsel keine Veränderungen am Messaufbau oder -umfeld erfolgten, ist die Dosisdifferenz von ca. 30 mGy nur durch das Vorhandensein einer dichteren Atmosphäre zu erklären. Mit diesem Versuch konnte damit ein qualitativer Nachweis des Vorhandenseins von Xenon in den Zellkulturflaschen erbracht werden. Da die Exposition der Flaschen gegenüber dem Edelgas zuvor mithilfe der in dieser Arbeit beschriebenen Methode erfolgt war, konnte somit gezeigt werden, dass diese sich zum Aufbau einer Xenonatmosphäre eignet und damit ihre Hauptanforderung erfüllt.

Insgesamt wurden die Ergebnisse der in diesem Abschnitt erläuterten Versuche als ausreichend gewertet, um die Methodik als valide zu erklären und an Zellkulturen anzuwenden. Da Raumluft menschlichem Weichteilgewebe nahezu dosisäquivalent ist, muss aufgrund der Messwerte von einer potenziellen Verstärkung der biologischen Dosis durch Xenon im Gewebe ausgegangen werden [89]. Im Hinblick auf mögliche In vivo-Folgeversuche wurde deswegen die Xenonexposition erst nach Bestrahlung angeschlossen. Ohnehin hätte die Bestrahlung einer Xenonatmosphäre aufgrund dosimetrischer Alterationen einen physikalisch bedingten Effekt auf das Zellüberleben, wohingegen hier die Wirkung auf Rezeptorebene im Vordergrund stehen soll [87].

4.1.4 Reliabilität

Die Ergebnisse aus dem klonogenen Überlebensassay zeigen über insgesamt drei Wiederholungen reproduzierbare signifikante Abweichungen für die xenonexponierten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Tabelle 7). Als wachstumsinhibierender Einfluss auf die Zellkultur kommt allein die Xenoneinwirkung infrage, da die Handhabung zwischen den Gruppen ansonsten nicht variiert wurde. Die

Reproduzierbarkeit dieser Beobachtungen in unabhängigen Wiederholungen beweist die Reliabilität der Methode. Die Methodik erfüllt damit zuverlässig die in sie gesetzten Erwartungen und kann infolge des erfolgreichen praktischen Einsatzes als etabliert gelten.

4.1.5 Alternativmethoden

Der Einfluss von Xenon auf Zellkulturen wurde bereits in einer Reihe von Publikationen untersucht. Das methodische Vorgehen für die Exposition in diesen Arbeiten ist mit dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen zumeist nicht vergleichbar, da mit geringeren Xenonkonzentrationen, Überdruckbedingungen oder deutlich geringerem Expositionsvolumen ohne Kapazitäten für T25-Zellkulturflaschen in ausreichender Quantität gearbeitet wurde [92-94].

Die Literatur beschreibt nur eine Methodik, welche die Xenonexposition unter vergleichbaren Bedingungen erlaubt [72, 95-97]. Die Zellkulturen werden dafür zunächst innerhalb eines ähnlichen Expositionsbehälters platziert. Unter dauerhaftem Gaseinstrom wird dann die ursprüngliche Raumlufatmosphäre im Behälter über ein Auslassventil ausgewaschen, und beim Erreichen von 5% CO₂ am Auslassventil der Gaszufluss abgeschlossen. Vorteil dieser Methode ist zunächst die Möglichkeit der Verifizierung des vollständigen Luftaustausches über die CO₂-Messung, der Gasverbrauch ist allerdings deutlich höher, da auch Teile der zugegebenen Gasmischung den Behälter wieder verlassen. Der Vorgang kann als kontinuierliche Verdünnungsspülung (sogenanntes *Continual-Dilution- bzw. Sweep-Through-Purging*) bezeichnet werden, und ist aus der chemischen Industrie als Verfahren der Inertisierung bekannt. Eine Formel kann dabei die benötigte Menge an Gasmischung Qt aus dem Volumen des Behälters V sowie der erwünschten Anfangs- und Endkonzentration des ursprünglichen Gasgemischs C_1 bzw. C_2 berechnen [98]:

$$Qt = \frac{V}{k} * \ln \frac{C_1}{C_2}$$

Der Faktor k gibt die Effizienz der Gasvermischung an, bei einer perfekten Durchmischung gilt $k = 1$, in der Praxis liegen die Werte eher zwischen 0,2-0,8 [98]. Unter Annahme einer idealen Mischung wird demzufolge für den Austausch von 99 % der Atmosphäre eines Volumens wie dem zuvor beschriebenen Behälter ein mindestens 4,6-fach größeres Gasvolumen benötigt.

Die Aufwendungen liegen im Vergleich zu der in dieser Arbeit beschriebenen Methode also wenigstens 4,6-mal höher. Im Falle einer nicht idealen Gasvermischung ist dieser Betrag nochmals durch Division mit dem Faktor k zu korrigieren. Von daher ist diese Methode aus wirtschaftlichen Gesichtspunkten für die Verwendung mit kleinvolumigen Zellkulturträgern wie Lochplatten eher geeignet als für die Xenonexposition der größeren, zusätzlich initial raumluftgefüllten T25-Flasks.

4.2 NMDA-Rezeptorantagonisten im Überlebensassay

4.2.1 Eigentoxizität

Eine Verminderung der Plating Efficiency unter Exposition der Zellen gegenüber Xenon oder Memantin zunächst ohne zusätzliche Einwirkung ionisierender Strahlung kann Hinweise auf Eigentoxizität der zugesetzten Substanz geben. Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.1 zeigen, dass die alleinige Zugabe von Xenon (Gruppe A) oder Memantin (Gruppe C) die PE um den Faktor 0,94 reduzieren kann. Die PE der mit Xenon und Memantin behandelten Zellen (Gruppe B) wurde sogar um den Faktor 0,89 verringert. Im Vergleich zur Kontrolle ist dieser Effekt allerdings nicht statistisch signifikant. Eine Eigentoxizität von Xenon ohne additionalen Einfluss ionisierender Strahlen kann also allenfalls vermutet werden. Der Nachweis einer dosisabhängigen Memantin-Eigentoxizität auf U87MG-Zellen wurde bereits publiziert [20].

4.2.2 Strahlensensibilisierung

Diese Arbeit zeigt erstmals Hinweise auf eine Strahlensensibilisierung von Glioblastomzellen durch Xenon:

Die Surviving Fraction war in allen mit Xenon behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert, mit Ausnahme der Gruppe A2 (Xe, 2 Gy) war die Abweichung in sämtlichen Dosisgruppen ≥ 2 Gy statistisch signifikant. Die Ergebnisse zeigen ein vermindertes klonogenes Wachstum von GBM-Zellen nach Bestrahlung als Folge der Xenonexposition und unterstützen damit die Theorie einer Radiosensibilisierung der Tumorzellen durch das Edelgas. Memantinzugabe konnte diesen Effekt verstärken, während Memantin allein die Surviving Fraction nur innerhalb eines statistisch nicht-signifikanten Bereiches reduzieren konnte.

Bei der Analyse der linear-quadratischen Gleichungen werden in der Literatur höhere α - und β -Werte als Hinweis auf erhöhte Radiosensitivität gewertet [99]. Für die vorliegenden Daten erscheint der Vergleich der β -Parameter aufgrund der geringen Ausprägung der quadratischen Komponente in der Überlebenskurve nicht sinnvoll, in Gruppe A berechnet sich infolge eines statistischen Artefakts sogar ein negativer β -Wert [99]. Diese Beobachtung eines größtenteils linearen Kurvenverlaufs bis zu einer Gesamtdosis von 8 Gy deckt sich mit aus der Literatur verfügbaren dosisabhängigen Überlebenskurven der Zelllinie U87MG [78, 100-103].

Der Vergleich der α/β -Ratio, in der strahlenbiologischen Forschung als Parameter der Sensibilität des Gewebes gegenüber den Effekten einer Bestrahlungsfractionierung genutzt, ist bei den sehr geringen β -Werten ebenfalls eingeschränkt [99]. Die Fractionierungsempfindlichkeit ist in allen Gruppen grundsätzlich hoch, die teilweise

massiven Schwankungen der α/β -Ratio als statistisches Artefakt aus Veränderungen der dritten Nachkommastelle des β -Wertes zu werten.

Die Werte für α zeigen dagegen deutliche Abweichungen zwischen den Gruppen, sodass bei Vernachlässigung der β -Werte ein höherer α -Wert als Nachweis der Radiosensibilisierung betrachtet werden. Der größte Wert für α und damit die stärkste Sensibilisierung findet sich in der mit Xenon und Memantin behandelten Gruppe B, es ergeben sich außerdem in Hinblick auf Gruppen A und C Hinweise auf eine möglicherweise synergistische Wirkung beider Substanzen. Diese Beobachtung stützt eine Hypothese des voneinander unabhängigen Antagonismus beider Substanzen am NMDA-Rezeptor aufgrund der unterschiedlichen Bindungsstellen (vgl. Abbildung 1).

Die Ergebnisse zeigen zudem, dass bei den verwendeten Dosierungen der wachstumshemmende Effekt von Xenon dem des Memantins deutlich überlegen ist. Dabei wird bei einer Konzentration von 25 μM Memantin der in vivo erreichbare Wirkstoffspiegel deutlich überschritten, während Xenon in der verwendeten Konzentration von 50 % inhalativ zugeführt werden kann [50, 104].

Ursächlich für diese Observation könnten neben dem postulierten Mechanismus der Wachstumshemmung über den NMDAR-Antagonismus auch physikalische oder chemische Effekte des Xenongases an der Zellkultur sein. Der Ausschluss eines unbekanntes zytotoxischen Effekts, etwa aufgrund der erhöhten atmosphärischen Dichte, kann mit letzter Sicherheit nicht erfolgen, letztendlich spricht aber das Fehlen einer signifikant verringerten Plating Efficiency im Vergleich zur Kontrolle oder zu der mit Memantin allein behandelten Gruppe C dagegen.

4.3 Fazit

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Methodik erlaubt die sichere und reproduzierbare Xenonexposition von Zellkulturen in der gewünschten Konzentration. Im Vergleich mit den etablierten Methoden aus der Literatur bietet dieses Verfahren ökonomische Vorteile durch deutlich geringeren Gasverbrauch sowie die Möglichkeit der Anwendung ohne parallelen Einsatz von Messtechnik.

Die in dieser Pilotstudie festgestellten Unterschiede im klonogenen Zellüberleben nach Bestrahlung können ursächlich auf die Xenonexposition zurückgeführt werden und zeigen erstmals eine Strahlensensibilisierung von U87MG-Glioblastomzellen durch Xenon, die durch Memantinzugabe noch verstärkt werden kann. Während in der Literatur bereits für mehrere Substanzen oder zellbiologische Manipulationen eine in vitro Bestrahlungssensibilisierung von GBM-Zellen nachgewiesen werden konnte, kann Xenon insbesondere aufgrund seiner klinischen Zulassung, seiner ausgeprägten Liquorgängigkeit und des günstigen neuroprotektiven Nebenwirkungsprofils als ein

aussichtsreicher Kandidat für einen möglichen in vivo Radiosensitizer mit weitgehend unerforschtem Potential gelten [20, 101-103, 105].

Die beobachtete Strahlungsempfindlichkeitszunahme durch Xenonexposition der hier verwendeten U87MG-Zellen muss dafür zunächst in klonogenen Überlebensassays mit anderen GBM-Zelllinien reproduziert werden. Die Arbeitshypothese der zugrundeliegenden NMDA-Rezeptorinhibition könnte durch Falsifikation anhand einer nicht-NMDAR-exprimierenden Zelllinie untermauert werden.

Da bei der Arbeit mit Zellkulturen in vitro beobachtete Substanzeffekte häufig nicht uneingeschränkt in vivo abgebildet werden können, ist die Arbeit mit Glioblastomkulturen insgesamt nur als erster Schritt zu einer endgültigen und validen Aussage über das radiosensibilisierende Potential von Xenon zu werten [106]. Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 50% kann dabei über inhalative Applikation problemlos in den murinen oder humanen Organismus übertragen werden, ohne dass mit toxischen Begleiterscheinungen gerechnet werden muss [104, 107].

Perspektivisch stellt die Behandlung von Patienten mit bis zu 50% Xenon parallel zur Bestrahlung also keine Hürde dar. Die Nutzung eines radiosensibilisierenden Effekts des Edelgases in der radioonkologischen Behandlung des Glioblastoma multiforme könnte die notwendige Gesamtstrahlendosis bei gleicher Wirksamkeit reduzieren und damit auch Nebenwirkungen wie neurologischen Störungen oder Radionekrosen vorbeugen [108]. Alternativ ist unter Beibehaltung der Dosis eine verbesserte antitumorale Effektivität der Behandlung ohne vermehrte strahleninduzierte Nebenwirkungen denkbar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Glioblastoma multiforme als häufigster maligner hirneigener Tumor ist trotz laufender Forschungsbemühungen und Therapieverbesserungen nach wie vor mit einer äußerst ungünstigen Prognose verbunden. Als pathogenetisch relevanter Faktor der Erkrankung konnte gezeigt werden, dass die übermäßige glutamatvermittelte Aktivierung der Rezeptorionenkanäle NMDAR und AMPAR mit dem Absterben gesunden neuronalen Gewebes sowie einer Tumorwachstumsanregung verbunden ist. Für Glutamatantagonisten wie das Amantadin-Derivat Memantin konnte eine inhibitorische Wirkung auf das Tumorwachstum bei gleichzeitiger Neuroprotektion bereits nachgewiesen werden, außerdem kann das Medikament die Tumorzellen gegenüber radioaktiver Strahlung sensibilisieren. Einen ähnlichen Wirkmechanismus auf die glutamatergen NMDA- und AMPA-Rezeptoren zeigt das Edelgas Xenon, eine Untersuchung auf dessen zellbiologische Wirkung im radioonkologischen Kontext ist allerdings bislang noch nicht erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine kostengünstige Methode zur Xenonexposition bestrahlter Glioblastomzellen etabliert und eingesetzt werden, um die Auswirkungen des Edelgases auf die Tumorbilogie von GBM-Zellen zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde eine Methodik entwickelt, die über eine aufblasbare Hülle die Exposition von Zellkulturflaschen gegenüber einer spezifischen xenonhaltigen Gasmischung erlaubt. Versuche konnten nachweisen, dass das Verfahren funktioniert, ausreichende Dichtigkeit für den notwendigen Diffusionszeitraum gewährleistet, sowie dass eine Xenonexposition der Zellen über 24 Stunden mithilfe der entwickelten Techniken möglich ist. Der Xenonverbrauch konnte dabei auf ein Minimum reduziert werden. Damit wurden die Anforderungen an die Methode als erfüllt betrachtet.

Anschließend wurde die Glioblastomzelllinie U87MG in einem klonogenen Assay auf den Effekt der Kombination von Bestrahlung und Xenonexposition auf das Zellüberleben untersucht. Für die Exposition konnte dabei die zuvor entwickelte Methode eingesetzt werden. Es ergab sich eine reproduzierbare signifikante Minderung des Zellüberlebens mit zunehmender Strahlendosis in den xenonbehandelten Gruppen. Die Zugabe von Memantin konnte den Effekt verstärken.

Hiermit wurde erstmals der Nachweis einer Strahlensensibilisierung von GBM-Zellen durch Xenon erbracht. Damit ergeben sich erste Hinweise auf das Potential des klinischen Einsatzes von Xenon an Glioblastompatienten. Allerdings sind in vitro-Folgeversuche erforderlich, um den Xenoneinfluss auf das klonogenen Überleben anderer Zelllinien zu untersuchen. Die Exposition kann dabei sicher und kostengünstig mithilfe der in dieser Arbeit etablierten Methode erfolgen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Thakkar, J.P., et al., *Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014. **23**(10): p. 1985-96.
2. Kaatsch, P., et al., *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 2015.
3. Lin, D., et al., *Trends in Intracranial Glioma Incidence and Mortality in the United States, 1975-2018*. *Frontiers in Oncology*, 2021. **11**.
4. Wrensch, M., et al., *Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature*. *Neuro Oncol*, 2002. **4**(4): p. 278-99.
5. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. *Acta Neuropathol*, 2016. **131**(6): p. 803-20.
6. Chen, R., et al., *Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance*. *Neurotherapeutics*, 2017. **14**(2): p. 284-297.
7. Riede, U.-N. and M. Werner, *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 2017, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
8. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *The definition of primary and secondary glioblastoma*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(4): p. 764-72.
9. Szopa, W., et al., *Diagnostic and Therapeutic Biomarkers in Glioblastoma: Current Status and Future Perspectives*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 8013575.
10. Zong, H., L.F. Parada, and S.J. Baker, *Cell of origin for malignant gliomas and its implication in therapeutic development*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015. **7**(5).
11. Zong, H., R.G. Verhaak, and P. Canoll, *The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2012. **12**(4): p. 383-94.
12. Lee, J.H., et al., *Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations*. *Nature*, 2018. **560**(7717): p. 243-247.
13. Omuro, A. and L.M. DeAngelis, *Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review*. *Jama*, 2013. **310**(17): p. 1842-50.
14. Alexander, B.M. and T.F. Cloughesy, *Adult Glioblastoma*. *J Clin Oncol*, 2017. **35**(21): p. 2402-2409.
15. Mattle, H. and M. Mumenthaler, *Neurologie*. 2012: Georg Thieme Verlag.
16. Possinger, K., A.C. Regierer, and J. Eucker, *Facharztwissen Hämatologie Onkologie*. 2017, Jena: Fischer Gustav Verlag GmbH & Company KG.
17. Stupp, R., et al., *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial*. *Lancet Oncol*, 2009. **10**(5): p. 459-66.
18. Schipmann, S., et al., *Markers for Identifying and Targeting Glioblastoma Cells during Surgery*. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg*, 2019. **80**(6): p. 475-487.
19. da Silva, B., et al., *Spontaneous Glioblastoma Spheroid Infiltration of Early-Stage Cerebral Organoids Models Brain Tumor Invasion*. *SLAS Discov*, 2018. **23**(8): p. 862-868.
20. Müller-Längle, A., et al., *NMDA Receptor-Mediated Signaling Pathways Enhance Radiation Resistance, Survival and Migration in Glioblastoma Cells-A Potential Target for Adjuvant Radiotherapy*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(4).

21. Mahaney, B.L., K. Meek, and S.P. Lees-Miller, *Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining*. *Biochem J*, 2009. **417**(3): p. 639-50.
22. Stöver, I. and P. Feyer, *Praxismanual Strahlentherapie*. 2018: Springer.
23. Atkins, R.J., et al., *Repair mechanisms help glioblastoma resist treatment*. *J Clin Neurosci*, 2015. **22**(1): p. 14-20.
24. Niyazi, M., et al., *ESTRO-ACROP guideline "target delineation of glioblastomas"*. *Radiother Oncol*, 2016. **118**(1): p. 35-42.
25. Barazzuol, L., et al., *Evaluation of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 combined with radiotherapy and temozolomide in glioblastoma*. *Radiation oncology*, 2013. **8**(1): p. 65.
26. Dungey, F.A., D.A. Löser, and A.J. Chalmers, *Replication-Dependent Radiosensitization of Human Glioma Cells by Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase: Mechanisms and Therapeutic Potential*. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 2008. **72**(4): p. 1188-1197.
27. Lesueur, P., et al., *Poly-(ADP-ribose)-polymerase inhibitors as radiosensitizers: a systematic review of pre-clinical and clinical human studies*. *Oncotarget*, 2017. **8**(40): p. 69105-69124.
28. Jiapaer, S., et al., *Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma*. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2018. **58**(10): p. 405-421.
29. Herrlinger, U., et al., *Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial*. *Lancet*, 2019. **393**(10172): p. 678-688.
30. Wick, W., et al., *N2M2 (NOA-20) phase I/II trial of molecularly matched targeted therapies plus radiotherapy in patients with newly diagnosed non-MGMT hypermethylated glioblastoma*. *Neuro Oncol*, 2019. **21**(1): p. 95-105.
31. Hilf, N., et al., *Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma*. *Nature*, 2019. **565**(7738): p. 240-245.
32. *Glioblastoma Treatment With Irradiation and Olaptesed Pegol (NOX-A12) in MGMT Unmethylated Patients*. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04121455>.
33. An, Z., et al., *Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies*. *Oncogene*, 2018. **37**(12): p. 1561-1575.
34. Sautter, L., et al., *Open-Label Phase II Evaluation of Imatinib in Primary Inoperable or Incompletely Resected and Recurrent Glioblastoma*. *Oncology*, 2020. **98**(1): p. 16-22.
35. Schlegel, U., *Hirntumoren*, in *Klinische Neurologie*, P. Berlit, Editor. 2012, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 687-721.
36. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
37. Greenamyre, J.T. and R. Porter, *Anatomy and physiology of glutamate in the CNS*. *Neurology*, 1994. **44**(11 Suppl 8): p. S7-13.
38. Magnusson, K.R., *The aging of the NMDA receptor complex*. *Front Biosci*, 1998. **3**: p. e70-80.
39. Ghasemi, M. and S.C. Schachter, *The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: a review*. *Epilepsy Behav*, 2011. **22**(4): p. 617-40.
40. Alam, A., et al., *Neuroprotection and neurotoxicity in the developing brain: an update on the effects of dexmedetomidine and xenon*. *Neurotoxicology and teratology*, 2017. **60**: p. 102-116.

41. Venkataramani, V., et al., *Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression*. Nature, 2019. **573**(7775): p. 532-538.
42. Ye, Z.C. and H. Sontheimer, *Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate*. Cancer Res, 1999. **59**(17): p. 4383-91.
43. Ishiuchi, S., et al., *Ca²⁺-permeable AMPA receptors regulate growth of human glioblastoma via Akt activation*. J Neurosci, 2007. **27**(30): p. 7987-8001.
44. Nandakumar, D.N., et al., *Glioblastoma invasion and NMDA receptors: A novel prospect*. Physiol Int, 2019. **106**(3): p. 250-260.
45. Ramaswamy, P., et al., *Activation of NMDA receptor of glutamate influences MMP-2 activity and proliferation of glioma cells*. Neurol Sci, 2014. **35**(6): p. 823-9.
46. Walczak, K., et al., *Kynurenic acid inhibits proliferation and migration of human glioblastoma T98G cells*. Pharmacol Rep, 2014. **66**(1): p. 130-6.
47. Ishiuchi, S., et al., *Blockage of Ca²⁺-permeable AMPA receptors suppresses migration and induces apoptosis in human glioblastoma cells*. Nature Medicine, 2002. **8**(9): p. 971-978.
48. Chen, H.S. and S.A. Lipton, *The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists*. J Neurochem, 2006. **97**(6): p. 1611-26.
49. Lipton, S.A., *Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(2): p. 160-70.
50. Danysz, W., et al., *Aminoadamantanes as NMDA receptor antagonists and antiparkinsonian agents--preclinical studies*. Neurosci Biobehav Rev, 1997. **21**(4): p. 455-68.
51. Takano, T., et al., *Glutamate release promotes growth of malignant gliomas*. Nature Medicine, 2001. **7**(9): p. 1010-1015.
52. Maraka, S., et al., *Phase 1 lead-in to a phase 2 factorial study of temozolomide plus memantine, mefloquine, and metformin as postradiation adjuvant therapy for newly diagnosed glioblastoma*. Cancer, 2019. **125**(3): p. 424-433.
53. Chilukuri, S. and N. Burela, *Memantine for Prevention of Brain Irradiation-Induced Cognitive Toxicity: A Tale of an Underappreciated and Underused Intervention*. JCO Glob Oncol, 2020. **6**: p. 1384-1388.
54. Grossman, S.A., et al., *Talampanel with standard radiation and temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma: a multicenter phase II trial*. J Clin Oncol, 2009. **27**(25): p. 4155-61.
55. Corsi, L., A. Mescola, and A. Alessandrini, *Glutamate Receptors and Glioblastoma Multiforme: An Old "Route" for New Perspectives*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(7): p. 1796.
56. Korsunsky, G., *Xenon*. Int Anesthesiol Clin, 2015. **53**(2): p. 40-54.
57. Dinse, A., et al., *Xenon reduces glutamate-, AMPA-, and kainate-induced membrane currents in cortical neurones*. Br J Anaesth, 2005. **94**(4): p. 479-85.
58. Goto, T., et al., *The blood-gas partition coefficient of xenon may be lower than generally accepted*. Br J Anaesth, 1998. **80**(2): p. 255-6.
59. Deile, M., M. Damm, and A.R. Heller, *Inhalative Anästhetika*. Der Anaesthesist, 2013. **62**(6): p. 493-504.
60. Plougmann, J., et al., *Effect of stable xenon inhalation on intracranial pressure during measurement of cerebral blood flow in head injury*. Journal of neurosurgery, 1994. **81**(6): p. 822-828.
61. Ma, D., et al., *Neuroprotective and neurotoxic properties of the 'inert' gas, xenon*. Br J Anaesth, 2002. **89**(5): p. 739-46.
62. Bedi, A., et al., *Use of xenon as a sedative for patients receiving critical care*. Crit Care Med, 2003. **31**(10): p. 2470-7.

63. Stoppe, C., et al., *Sub-anesthetic Xenon Increases Erythropoietin Levels in Humans: A Randomized Controlled Trial*. *Sports Med*, 2016. **46**(11): p. 1753-1766.
64. Cullen, S.C. and E.G. Gross, *The anesthetic properties of xenon in animals and human beings, with additional observations on krypton*. *Science*, 1951. **113**(2942): p. 580-2.
65. Conzen, P., *Xenon revisited*. *Der Anaesthetist*, 2010. **59**(10): p. 881-882.
66. Bein, B., J. Höcker, and J. Scholz, *[Xenon--the ideal anaesthetic agent?]*. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 2007. **42**(11): p. 784-91.
67. Koziakova, M., et al., *Noble gas neuroprotection: xenon and argon protect against hypoxic-ischaemic injury in rat hippocampus in vitro via distinct mechanisms*. *Br J Anaesth*, 2019. **123**(5): p. 601-609.
68. Bürge, M., et al., *The anaesthetic xenon partially restores an amyloid beta-induced impairment in murine hippocampal synaptic plasticity*. *Neuropharmacology*, 2019. **151**: p. 21-32.
69. Laitio, R., et al., *Effect of Inhaled Xenon on Cerebral White Matter Damage in Comatose Survivors of Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Randomized Clinical Trial*. *Jama*, 2016. **315**(11): p. 1120-8.
70. Law, L.S., et al., *Neurologic and cognitive outcomes associated with the clinical use of xenon: a systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials*. *Can J Anaesth*, 2018. **65**(9): p. 1041-1056.
71. *Xenon for Neuroprotection During Post-Cardiac Arrest Syndrome in Comatose Survivors of an Out of Hospital Cardiac Arrest*. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03176186>.
72. Ash, S.A., et al., *Xenon decreases cell migration and secretion of a pro-angiogenesis factor in breast adenocarcinoma cells: comparison with sevoflurane*. *Br J Anaesth*, 2014. **113 Suppl 1**: p. i14-21.
73. Dähn, S., et al., *Influence of different gases used for laparoscopy (helium, carbon dioxide, room air, and xenon) on tumor volume, histomorphology, and leukocyte-tumor-endothelium interaction in intravital microscopy*. *Surg Endosc*, 2005. **19**(1): p. 65-70.
74. Vaisala, *GM70 Datasheet Ref. B210824DE-E*. 2016. p. <https://www.vaisala.com/sites/default/files/documents/CEN-G-GM70-Datasheet-B210824DE.pdf>.
75. Greisinger, *Produktinformation Handmessgeräte Gasanalyse*. p. https://www.greisinger.de/files/upload/de/produkte/kat/k18_078_DE_oP.pdf.
76. You, Y., et al., *Measurement of air exchange rates in different indoor environments using continuous CO2 sensors*. *Journal of Environmental Sciences*, 2012. **24**(4): p. 657-664.
77. Short, S.C., et al., *DNA repair after irradiation in glioma cells and normal human astrocytes*. *Neuro Oncol*, 2007. **9**(4): p. 404-11.
78. Lopez Perez, R., et al., *DNA damage response of clinical carbon ion versus photon radiation in human glioblastoma cells*. *Radiotherapy and Oncology*, 2019. **133**: p. 77-86.
79. Schlick-Hasper, E., M. Neitsch, and T. Goedecke, *Industrial leak testing of dangerous goods packagings*. *Packaging Technology and Science*, 2020. **33**(7): p. 273-286.
80. Kalliokoski, P., R. Niemelä, and J. Salmivaara, *The tracer gas technique — A useful tool for industrial hygiene*. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 1980. **6**(2): p. 123-130.

81. Cussler, E.L. and E.L. Cussler, *Diffusion: mass transfer in fluid systems*. 2009, Cambridge: Cambridge university press.
82. Györe, D., S.M.V. Gilfillan, and F.M. Stuart, *Tracking the interaction between injected CO₂ and reservoir fluids using noble gas isotopes in an analogue of large-scale carbon capture and storage*. *Applied Geochemistry*, 2017. **78**: p. 116-128.
83. Nimz, G. and G. Hudson, *The Use of Noble Gas Isotopes for Monitoring Leakage of Geologically Stored CO₂*. 2005. p. 1113-1128.
84. OpenStax, *Chemistry*. 2016: OpenStax CNX.
85. Jousten, K.H., *Handbuch Vakuumtechnik*. Vol. 12. 2018, Wiesbaden: Springer Vieweg.
86. Khalil, A.A., et al., *The Influence of Hypoxia and pH on Bioluminescence Imaging of Luciferase-Transfected Tumor Cells and Xenografts*. *International Journal of Molecular Imaging*, 2013. **2013**: p. 287697.
87. Schulz, R.J., A.M. Markoe, and R. Anigstein, *Xenon: Effect on Radiation Sensitivity of HeLa Cells*. *Science*, 1969. **163**(3867): p. 571-572.
88. Rudek, B., et al., *Ultra-efficient ionization of heavy atoms by intense X-ray free-electron laser pulses*. *Nature Photonics*, 2012. **6**(12): p. 858-865.
89. Krieger, H., *Detektoren mit Gasfüllung*, in *Strahlungsmessung und Dosimetrie*. 2011, Vieweg+Teubner: Wiesbaden. p. 25-54.
90. Wiegleb, G., *Gasmestechnik in Theorie und Praxis*. 2016, Wiesbaden: Springer Vieweg.
91. Scheidegger, S., *Grundlagen der Strahlenphysik und Dosimetrie*. 2002.
92. Campos-Pires, R., et al., *Xenon protects against blast-induced traumatic brain injury in an in vitro model*. *Journal of Neurotrauma*, 2018. **35**(8): p. 1037-1044.
93. Petzelt, C., et al., *Prevention of neurotoxicity in hypoxic cortical neurons by the noble gas xenon*. *Life Sciences*, 2003. **72**(17): p. 1909-1918.
94. Liu, F., et al., *Protective Effects of Xenon on Propofol-Induced Neurotoxicity in Human Neural Stem Cell-Derived Models*. *Molecular Neurobiology*, 2020. **57**(1): p. 200-207.
95. Lavaur, J., et al., *Xenon-mediated neuroprotection in response to sustained, low-level excitotoxic stress*. *Cell death discovery*, 2016. **2**(1): p. 1-9.
96. Wilhelm, S., et al., *Effects of xenon on in vitro and in vivo models of neuronal injury*. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 2002. **96**(6): p. 1485-1491.
97. Spaggiari, S., et al., *Antiapoptotic activity of argon and xenon*. *Cell cycle*, 2013. **12**(16): p. 2636-2642.
98. Kinsley Jr, G.R., *Properly purge and inert storage vessels*. *Natural gas (Pittsburgh)*, 2001. **12**: p. 14.5.
99. van Leeuwen, C.M., et al., *The alfa and beta of tumours: a review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies*. *Radiat Oncol*, 2018. **13**(1): p. 96.
100. Steenken, C., et al., *Impact of flattening-filter-free radiation on the clonogenic survival of astrocytic cell lines*. *Strahlenther Onkol*, 2015. **191**(7): p. 590-6.
101. Sun, C., et al., *Endocytosis-mediated mitochondrial transplantation: Transferring normal human astrocytic mitochondria into glioma cells rescues aerobic respiration and enhances radiosensitivity*. *Theranostics*, 2019. **9**(12): p. 3595-3607.
102. Liang, L., et al., *MicroRNA-223 Enhances Radiation Sensitivity of U87MG Cells In Vitro and In Vivo by Targeting Ataxia Telangiectasia Mutated*. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 2014. **88**(4): p. 955-960.

103. Han, T.J., et al., *Inhibition of STAT3 enhances the radiosensitizing effect of temozolomide in glioblastoma cells in vitro and in vivo*. J Neurooncol, 2016. **130**(1): p. 89-98.
104. Lawley, J.S., et al., *Safety, hemodynamic effects, and detection of acute xenon inhalation: rationale for banning xenon from sport*. J Appl Physiol (1985), 2019. **127**(6): p. 1511-1518.
105. Wang, J., et al., *Delta-6-desaturase inhibitor enhances radiation therapy in glioblastoma in vitro and in vivo*. Cancer Manag Res, 2018. **10**: p. 6779-6790.
106. Emami, J., *In vitro-in vivo correlation: from theory to applications*. J Pharm Pharm Sci, 2006. **9**(2): p. 169-189.
107. Campos-Pires, R., et al., *Xenon improves neurologic outcome and reduces secondary injury following trauma in an in vivo model of traumatic brain injury*. Crit Care Med, 2015. **43**(1): p. 149-158.
108. Cuccurullo, V., et al., *The Molecular Effects of Ionizing Radiations on Brain Cells: Radiation Necrosis vs. Tumor Recurrence*. Diagnostics (Basel), 2019. **9**(4).

7 SONSTIGES

EPA patent application 21 184 988 (2021)

Applicant: Universität Heidelberg, Inventors: Ruder A.M., Giordano F.A.

- Patent pending

Publikation im Anschluss an das Patentverfahren

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Thomas Christian Büttner
Geburtsdatum: 11. November 1994
Geburtsort: Göttingen
Familienstand: Ledig
Vater: Prof. Dr. med. Roland Büttner
Mutter: Dr. med. Angela Büttner

SCHULISCHER WERDEGANG

2000 – 2004 Montessori-Grundschule Regensburg
2004 – 2012 Albertus-Magnus-Gymnasium Regensburg
29.06.2012 Abitur

NICHTAKADEMISCHER WERDEGANG

09/2012 – 08/2013 Freiwilliges Soziales Jahr, Bezirksklinikum Regensburg
10/2013 – 04/2014 Ausbildung zum Rettungssanitäter, RKT Regensburg

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

10/2014 – 11/2020 Studium Humanmedizin
Universität Heidelberg, Med. Fakultät Mannheim
16.09.2016 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2,0)
30.10.2019 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2,0)
09.11.2020 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2,0)

BERUFLICHER WERDEGANG

Seit 01/2021

Assistenzarzt

Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie

Universitätsklinikum Bonn

Leitung: Prof. Dr. med. Manuel Ritter

9 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Frank A. Giordano danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die problemlose Bereitstellung aller benötigten Materialien, Kapazitäten und Ressourcen.

Meinem Betreuer Herr Dr. Arne Ruder danke ich für seine Hilfestellung in sämtlichen Bereichen der Arbeit, organisatorischen Leistungen im Hintergrund, ständige Verfügbarkeit, ausgezeichnete wissenschaftliche Didaktik und seinen motivierenden Optimismus.

Dem Team des Labors für zelluläre und molekulare Radioonkologie, insbesondere Herrn Prof. Dr. sc. hum Marlon R. Veldwijk sowie den MTLAs Adriana Grbenicek und Miriam Bierbaum danke ich für die hervorragende Einarbeitung und jederzeit verfügbare Hilfestellung in den Bereichen Laborarbeit, Zellkulturen und statistische Auswertung.

Herrn Willi Mack bin ich für seine Hilfe bei der Umsetzung der handwerklichen Anteile des Projekts und freundliche Bereitstellung seiner Räumlichkeiten dankbar, dem Team am Linearbeschleuniger 4 der Klinik für Strahlentherapie, Universitätsmedizin Mannheim für die Unterstützung der experimentellen Zellbestrahlung trotz laufender Patientenversorgung.

Bei meiner Freundin Rebecca Wallenwein bedanke ich mich für uneingeschränkte Motivation, Ablenkung und Unterstützung über den gesamten Projektzeitraum, ebenso bei meinen Mitbewohnern Armin Pooyeh und Ralf Schmidt.

Besonderen Dank schulde ich meinen Eltern Frau Dr. Angela Büttner und Prof. Dr. Roland Büttner für ihre materielle und immaterielle Unterstützung im Verlauf meines gesamten Studiums sowie für ihr wissenschaftliches Vorbild.