



Bundesministerium
für Umwelt, Naturschutz
und Reaktorsicherheit

SCHRIFTENREIHE REAKTORSICHERHEIT UND STRAHLENSCHUTZ

BIOLOGISCHE WIRKSAMKEIT VON AUGER-ELEKTRONEN EMITTIERENDEN RADIONUKLIDEN

BMU - 2005-659



WIR STEuern UM AUF ERNEUERBARE ENERGIEN.

BMU – 2005-659

**„Biologische Wirksamkeit von Auger-Elektronen
emittierenden Radionukliden“**

Forschungszentrum Jülich GmbH

Geschäftsbereich Sicherheit und Strahlenschutz

Experimenteller Teil: Dr. F.H.A. Schneeweiss

Theoretischer Teil: Dr. E. Pomplun

Fachbegleiter:

Dr. Noßke/Dr. Hornik

IMPRESSUM

Dieser Band enthält einen Abschlussbericht über ein vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) gefördertes Vorhaben. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BMU übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Eigentümer behält sich alle Rechte an der weiteren Nutzung oder Vervielfältigung des Berichts vor.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BMU übereinstimmen.

Herausgeber:

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit
Referat RS I 2
Postfach 12 06 29
53048 Bonn

Erscheinungsjahr: 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Aufgabenstellung und Zielsetzung	4
2	Stand der Wissenschaft	5
2.1	Experimentelle Befunde	5
2.2	Mikrodosimetrische Modellierung	6
2.3	Strahlungswichtungsfaktoren	7
3	Experimentelle Untersuchungen	8
3.1	Einleitung	8
3.2	Methodik und Durchführung	8
3.2.1	Voruntersuchungen	8
3.2.2	Hauptuntersuchungen	11
3.3	Ergebnisse und Diskussion	17
3.3.1	Gesamtpopulation und Einzelzell-DNA nach ^{125}I -Exposition	17
3.3.2	Korrelation zwischen Chromatinschäden und Koloniebildungsfähigkeit	19
4	Modell-theoretische Untersuchungen	22
4.1	Einleitung	22
4.2	Methodik	22
4.2.1	Generierung von Auger-Elektronen-Spektren	22
4.2.2	Bahnspur-Rechnungen	23
4.3	Ergebnisse und Diskussion	23
4.3.1	Auger-Elektronen-Spektren	23
4.3.2	Bahnspur-Rechnungen / Simulation von DNA-Schäden	32
5	Strahlenwichtungsfaktoren	35
5.1	Kombinierte Wichtungsfaktoren	35
5.2	^{125}I	35
5.2.1	Klonogenes Überleben	35
5.2.2	DNA-Schädigungen	37
5.3	^{123}I	37
5.4	^{99m}Tc	38
6	Zusammenfassung / Summary	40
7	Literatur	41

1 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Für Radionuklide, die über Elektronen-Einfang bzw. innere Konversion zerfallen und dabei eine Vielzahl niederenergetischer Auger-Elektronen mit extrem kurzen Reichweiten emittieren, liegen bisher keine allgemein akzeptierten Strahlenwichtungsfaktoren vor. Um die Radiotoxizität dieser Nuklide zu quantifizieren, soll ihre biologische Wirksamkeit im Vergleich zu Niedrig-LET-Strahlung untersucht werden.

Dazu werden in-vitro-Untersuchungen zur Bestimmung von molekularen und zellulären Schäden an asynchronen Zellkulturen mit verschiedenen Auger-Elektronen-Emittern in unterschiedlichen biologischen Targets (DNA, Zellkern, Plasma) durchgeführt. Da eine Aufnahme in die DNA aber nur in S-Phase-Zellen stattfindet, kommt es hier, im Gegensatz zur externen Niedrig-LET-Strahlung, innerhalb der Zellkultur zu einer stark inhomogenen Exposition einzelner Zellen. Um einen Vergleich zwischen beiden Strahlenarten auf der Basis ausschließlich geschädigter Zellen zu ermöglichen, soll mittels COMET-Assay zwischen geschädigten und ungeschädigten Zellen differenziert werden.

Parallel zu diesen experimentellen Untersuchungen soll versucht werden, mit modernen mikrodosimetrischen Methoden, wie z.B. Computersimulationen des Nuklidzerfalls sowie der Elektronenbahnsuren und deren Überlagerung mit DNA-Targetmodellen, zu einem genaueren Verständnis der Strahlenwirkungsmechanismen zu gelangen. Dazu ist zunächst einmal eine möglichst genaue Kenntnis der Auger-Elektronen-Spektren erforderlich. Da experimentell ermittelte Spektren für die hier interessierenden Nuklide nicht vorliegen, soll auf Monte-Carlo-Simulationen zurückgegriffen werden.

2 Stand der Wissenschaft

In den vergangenen drei Jahrzehnten haben in der Strahlenbiologie und in der Nuklearmedizin Radionuklide ein zunehmend starkes Interesse gefunden, die über Elektronen-Einfang bzw. innere Konversion zerfallen. Diese Prozesse, wie auch Photonenstrahlung geeigneter Energie, verursachen eine Fehlstelle in einer der inneren Schalen der Elektronenhülle. Diese Fehlstelle wiederum ist Ausgangspunkt für eine komplexe, stochastisch ablaufende Kaskade von strahlungslosen Elektronen-Übergängen, in deren Verlauf eine Vielzahl niederenergetischer Auger-Elektronen emittiert wird. Dem stochastischen Charakter dieser Übergänge entsprechend, zeigen einzelne Zerfälle derselben Nuklidart ganz unterschiedliche individuelle Auger-Elektronen-Spektren. Für ^{125}I beispielsweise, dem wohl prominentesten Vertreter dieser Klasse von Radionukliden in der Strahlenbiologie, wurden Elektronenzahlen von maximal 25 mit im Mittel 12 pro Zerfall in Monte-Carlo (MC)-Simulationen gefunden (siehe auch Kap. 2.2). Die mit diesen Elektronen in einzelnen Zerfällen freigesetzte Energie variiert zwischen etwa 50 eV und 70 keV. Der größte Teil dieser Auger-Elektronen besitzt kinetische Energien zwischen wenigen eV und etwa 500 eV und infolgedessen extrem kurze Reichweiten von etwa 1 bis 20 nm in biologischem Gewebe. Der niederenergetische Bereich unterhalb von 500 eV tritt bei allen Auger-Emittern auf, wobei lediglich Unterschiede in der Anzahl der Elektronen bestehen.

Hinsichtlich der strahlenbiologischen Konsequenzen des Zerfalls von Auger-Elektronen-Emittern nach Inkorporation sowie hinsichtlich des Verständnisses der beteiligten Mechanismen und ihrer Auswirkungen auf Strahlungswichtungsfaktoren liegen heute die im folgenden skizzierten Ergebnisse vor.

2.1 Experimentelle Befunde

Experimentelle Untersuchungen wurden für verschiedene Endpunkte auf molekularer wie auf zellulärer Ebene in zahlreichen Laboratorien durchgeführt. Von der Vielzahl Auger-Elektronen emittierender Radionuklide mit Re-

levanz für die Nuklearmedizin und den Strahlenschutz (beispielsweise ^{51}Cr , ^{55}Fe , ^{67}Ga , ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , etc.) wurde bisher vorzugsweise ^{125}I untersucht, das in Form von $^{125}\text{IUdR}$ in die DNA inkorporiert werden kann. Dabei zeigte sich, daß diese Nuklide starke radiotoxische Effekte hervorrufen können.

Molekulare Schäden wurden nach Einbau von Auger-Emittern in die DNA beobachtet. So führte beispielsweise ein Zerfall von ^{125}I im Mittel zu 3 - 6 Einzelstrangbrüchen und zu einem Doppelstrangbruch der DNA. Mit einer speziellen Markierungstechnik [Mar81] gelang der Nachweis, daß die aus einem individuellen Zerfall resultierenden Strangbrüche in unmittelbarer Nähe des Zerfallsorts liegen, und zwar mit einem Häufigkeitsmaximum im selben bzw. benachbarten Nukleotid.

Auf zellulärer Ebene wurde bei Experimenten zur Koloniebildungsfähigkeit eine deutliche Abhängigkeit von der intrazellulären Verteilung der Radionuklide gefunden. Wird der Auger-Emitter in die DNA kovalent eingebunden, ergibt sich ein Effekt wie nach Hoch-LET-Strahlung. Gebunden an die Zellmembran, ist die Wirkung dagegen ähnlich der von Niedrig-LET-Strahlung.

Seit den ersten experimentellen Nachweisen schwerer Chromatin-Schäden durch DNA-inkorporiertes ^{125}I [Hof71, Fei71] wurden verschiedene Mechanismen zur Erklärung dieses sogenannten 'Auger-Effektes' diskutiert: der Schauer niederenergetischer Auger-Elektronen, der während des ^{125}I -Zerfalles emittiert wird, die Transmutation von Iod zu Tellur und die dabei auftretenden chemischen Veränderungen, der Rückstoß des zerfallenden Kernes und nicht zuletzt eine 'Coulomb-Explosion' aufgrund Ionenfragment-Verteilungen, die nach dem Zerfall von molekular-gebundenem ^{125}I in der Gasphase gefunden worden war [Car63, Car66]. Die Rückstoßenergie hat sich allerdings als zu klein für die Induktion des Auger-Effektes erwiesen. Auch Iod und seine Chemie können ausgeschlossen werden, da der ^{125}I -Effekt sich deutlich z.B. von dem durch ^{131}I hervorgerufenen unterscheidet, das über β^- -Zerfall in Xenon umgewandelt wird, während ^{125}I nach Tellur zerfällt. Theoretisch könnte somit auch die Transmutation zu Tellur aus-

schlaggebend sein, jedoch konnte ein signifikanter Unterschied in der biologischen Wirksamkeit zwischen den beiden Iodisotopen ^{123}I und ^{125}I [Mak89] gefunden werden, die beide zu Tellur zerfallen.

Inwieweit ein möglicher Ladungseffekt, der dadurch entsteht, daß infolge der Elektronen-Emission eine vielfache positive Ladung auf dem Tochternuklid zurückbleibt, neben der Elektronen-Strahlung zum molekularen Schaden beiträgt, ist z.Z. noch offen. Die beiden einzigen experimentellen Studien hierzu [Car63, Car66] deuten darauf hin, daß mit ^{125}I markierte organische Moleküle in der Gasphase infolge 'Coulomb-Explosion' zerstört werden. Ob ein solcher Ladungseffekt auch in der kondensierten Phase auftritt oder durch Neutralisationsprozesse während der Auger-Kaskade verhindert wird, ist zum jetzigen Zeitpunkt ebenfalls ungeklärt.

Darüber hinaus haben neuere Untersuchungen mit synchronisierten Zellen gezeigt, daß ^{125}I -Zerfälle in neu replizierter DNA (frühe S-Phase) einen Niedrig-LET-Effekt hinsichtlich Überleben hervorrufen, während Zerfälle in der späten S-Phase zu schulterlosen Überlebenskurven führen. Diese Ergebnisse werden gegenwärtig so interpretiert, daß das entscheidende radiosensitive Target zum Zellüberleben die hochgeordnete Struktur des Genoms darstellt und weniger die noch nicht strukturell eingebundene, neu entstandene DNA.

2.2 Mikrodosimetrische Modellierung

Nicht zuletzt die Erkenntnis, den durch die Auger-Elektronen-Emitter gesetzten intensiven und stark lokalisierten Strahlenschaden für eine effektive Tumorthherapie nutzen zu können, führte schon frühzeitig zu Versuchen, eine theoretische Erklärung der experimentellen Befunde bzw. der beteiligten Mechanismen zu finden. Dabei zeigte sich, daß die Wirkung der Auger-Elektronen mittels konventioneller makrodosimetrischer Verfahren nicht zufriedenstellend zu erklären ist. Gegenwärtig geht man von den Auger-Elektronen als alleiniger Ursache aus, und hierbei insbesondere von den extrem niederenergetischen unterhalb von 500 eV. Eng

verbunden mit der genauen Bestimmung dieser aus den höheren Energieniveaus stammenden Elektronen ist die Frage nach einem möglichen Ladungseffekt (s. Kap. 2.1).

Die wichtigste Datenbasis für Dosisberechnungen bzw. Modellierungen stellen die mit MC-Simulationen gewonnenen Auger-Spektren dar. Im wesentlichen werden heute zwei unterschiedliche Modelle verwendet, die in ihrem Kern aber auf ein einziges, von Charlton entwickeltes Modell [Cha81] zurückgehen. Das eine basiert, hinsichtlich der Berechnung der kinetischen Elektronen-Energien, auf einer modifizierten $(Z+1)$ -Näherung und führt insgesamt zu einer fehlerhaften Energiebilanz mit Werten für einzelne Elektronen, die bis zu 100 % von den Werten des anderen Modells abweichen, das eine exakte Energiebilanz nachweisen kann. Dies trifft vor allem für die aus Übergängen zwischen höher gelegenen Niveaus stammenden niederenergetischen Elektronen zu, die in besonders starker Weise zu dem kurzreichweitigen biologischen Effekt beitragen. Beide Modelle leiden unter fehlenden experimentellen Daten für Übergangswahrscheinlichkeiten in mehrfach geladenen Atomen und müssen aus den Daten für einfach ionisierte Atome näherungsweise extrapolieren. Eine experimentelle Datenbasis fehlt auch zur Klärung der Frage, inwieweit in der kondensierten Materie ein Ladungstransfer (s. Kap. 2.1) während der Auger-Kaskade möglich ist. Ist ein solcher Ladungsausgleich schnell genug, kommt es zu einer Verlängerung der Kaskade und damit zu einer deutlich größeren Zahl emittierter Auger-Elektronen. Erweist sich die Kaskade als schneller, so entsteht ein relativ großes Ladungspotential mit möglichen drastischen Konsequenzen für das den Auger-Emitter enthaltende Molekül. Für beide Modelle steht eine experimentelle Verifizierung der mit ihnen simulierten Spektren gegenwärtig noch aus.

Mittlerweile wird versucht, über moderne mikrodosimetrische Methoden, wie z.B. Bahnspur-Simulationen, zu einem Verständnis der außerordentlich starken Wirkung der Auger-Emitter zu gelangen. Die hiermit erzielten Ergebnisse in Hinblick auf die Strangbruchausbeuten geben die experimentellen Befunde relativ gut wieder. Bei einem Vergleich von verschiedenen Schadensmustern

streuen die Ergebnisse aber erheblich. Die großen Unterschiede resultieren aus dem Einfluß verschiedener Parameter, die gegenwärtig z.T. kontrovers diskutiert werden. Dazu gehören die Targetgröße und -struktur, der Einfluß der indirekten Effekte und die für eine Strangbruchinduktion erforderliche Minimalenergie; insbesondere ist hier aber auf Unterschiede im Energiespektrum der Elektronen hinzuweisen (siehe oben).

2.3 Strahlungswichtungsfaktoren

Ein allgemein akzeptierter Strahlenwichtungsfaktor zur Beurteilung der relativen biologischen Wirksamkeit von Auger-Elektronen-Emittern liegt derzeit nicht vor, abgesehen von einzelnen z.T. stark differierenden RBW-Werten. Somit ergibt sich unter Strahlenschutzaspekten die Notwendigkeit, die biologische Wirksamkeit dieser Nuklide im Vergleich zu konventioneller Niedrig-LET-Strahlung zu quantifizieren.

Da zur Ermittlung von RBW-Werten definitionsgemäß Dosiswerte miteinander verglichen werden müssen, ist hierfür auch immer die Festlegung eines Referenzvolumens erforderlich. Während für Niedrig-LET-Strahlung zumindest im hohen Dosisbereich von einer relativen Gleichverteilung der Energiedepositionsergebnisse und somit von einer homogenen Dosisverteilung ausgegangen werden kann, sind im Niedrigdosisbereich große Fluktuationen der deponierten Energie auf zellulärer Ebene zu erwarten. Hoch-LET-Strahlung induziert ein grundsätzlich anderes räumliches Verteilungsmuster der Energiedepositionen, so daß selbst im Hochdosisbereich ein Vergleich mit Niedrig-LET-Strahlung in sehr sensitiver Weise vom gewählten Referenzvolumen abhängt.

Auger-Elektronen-Emitter, deren Energieverteilungsmuster neben einer Niedrig-LET-Komponente aus einem - aus zellulärer Sicht - nahezu punktförmigen Cluster von Ionisationen und Anregungen bestehen, verstärken die Frage nach dem adäquaten Referenzvolumen noch mehr als 'herkömmliche' Hoch-LET-Strahlung.

Alle Versuche, einen sinnvollen Dosiswert für

diese Radionuklide zu berechnen, haben bisher zu mehr oder weniger willkürlichen Ergebnissen ohne allzu große Aussagekraft geführt. So wurden in der Vergangenheit beispielsweise für ^{125}I RBW-Werte bis zu 70 je nach Endpunkt für den Niedrigdosisbereich sowie Qualitätsfaktoren zwischen 10 und 40 für DNA-gebundenes ^{125}I publiziert, wobei sich eine deutliche Abhängigkeit von der intrazellulären Lokalisation und dem verwendeten Energiespektrum ergab. Alleine schon die Streubreite dieser Daten reflektiert in deutlicher Weise die geschilderte Problematik.

3 Experimentelle Untersuchungen

3.1 Einleitung

Zur experimentellen Ermittlung der biologischen Wirksamkeit von Auger-Elektronen emittierenden Nukliden wurden *in-vitro*-Untersuchungen mit ^{125}I als quasi Hoch-LET- und zum Vergleich mit ^{137}Cs - γ -Strahlung als Niedrig-LET-Strahler an einer tierischen und zwei menschlichen Zell-Linien durchgeführt. Dabei wurde das ^{125}I mittels verschiedener Trägermoleküle als $^{125}\text{IUdR}$ ausschließlich in der DNA gebunden, als $^{125}\text{I-AP}$ über die gesamte Zelle verteilt und als Na^{125}I außerhalb der Zelle positioniert.

Bei den Vorversuchen zur Auswahl geeigneter Methoden für gen- bzw. zytotoxische Endpunkte konnten v.a. für die Ermittlung der genotoxischen Daten, wie z.B. die zur Bestimmung von HGPRT-Mutationen als auch die zur Bestimmung von DNA-Schäden mittels der Poly-ADP-ribosylation, nicht die erwünschte Empfindlichkeit unter den hier erforderlichen Bedingungen gefunden werden. Daher wurde zunächst zur Schadensmessung auf molekularer Ebene, wie z.B. der DNA-Strangbruchinduktion, die Hydroxylapatitchromatographie und der sog. COMET-Assay bevorzugt. Letztere Methode erlaubt es, DNA-Schäden in Einzelzellen optisch zu erkennen. Für die Ermittlung zytotoxischer Endpunkte wurde auf die Methode der clonogene Bildungsrate (Kolonie-Assay) und für die Vitalitätsbetrachtungen auf die Registrierung struktureller und funktioneller Zellmembranschäden zurückgegriffen. Aus beiden Methoden, Kolonie- und COMET-Assay, sollte somit möglichst eine Korrelation zwischen zellulärem Schaden der Gesamtpopulation und singulärem DNA-Schaden der Einzelzelle abgeleitet werden.

Da die strahlenbedingten Effekte unter physiologischen Bedingungen (37°C , Vollmedium, keine Synchronisation) untersucht werden sollten, mußten z.B. die Inkorporationsschritte für den Einbau von ^{125}I als $^{125}\text{IUdR}$ in die zelluläre DNA der nicht-synchronisierten Kulturzellen sorgfältig ermittelt werden.

3.2 Methodik und Durchführung

Als Zell-Linien wurden die menschlichen Nieren-T1- und Glioblastomzellen 86HG-39 sowie später die Ratten-Zell-Linie Rhabdomyosarkom R1H ausgewählt und in ihrer nicht-synchronisierten Form auf ihre Vitalität und Strahlenempfindlichkeit untersucht. Darüber hinaus wurden Wachstumskurven aufgenommen sowie die Phasenverteilung des Zellzyklus bestimmt.

Aufgrund der Ergebnisse aus diesen Voruntersuchungen wurden die Zellen als Monolayer kultiviert, und es wurden folgende *in-vitro*-Experimente durchgeführt:

- (1) Bestimmung des Überlebens als Funktion steigender radioaktiver Dosen mittels Koloniebildungstest;
- (2) Bestimmung von DNA-Schäden mit Hilfe des COMET-Assays;
- (3) Messung von DNA-Strangbrüchen mittels Hydroxylapatit-Chromatographie.

3.2.1 Voruntersuchungen

Vitalitätstest (Trypanblau)

Der Farbttest auf Lebensfähigkeit der aus tiefgefrorenem Zustand erhaltenen Zellen unterscheidet zwischen membran-ungeschädigten und membran-geschädigten Zellen, in dem bei letzteren infolge von Membrandefekten das Zytoplasma und auch der Kern innerhalb einer definierten Zeit (z.B. 4 min) durch Trypanblau (0,4 %-ige Lösung) angefärbt wurde. Diese Zellen werden definitionsgemäß als tote Zellen betrachtet. Das Verhältnis von ungefärbten Zellen zur Gesamtzellzahl ergibt die Vitalitätsrate.

Nach ^{137}Cs - γ -Bestrahlung zeigte sich sowohl bei T1- als auch bei 86HG-39-Zellen im Dosisbereich von 1 - 20 Gy eine leichte Abnahme der Vitalitätsrate auf 88 bzw. 91 % (s. Abb. 1).

Acetylcholinesterase-Test (AChE-Test)

Zelluläre Membranschäden können durch Strahleneinwirkung hervorgerufen werden. Hierbei treten neben Veränderungen in Mem-

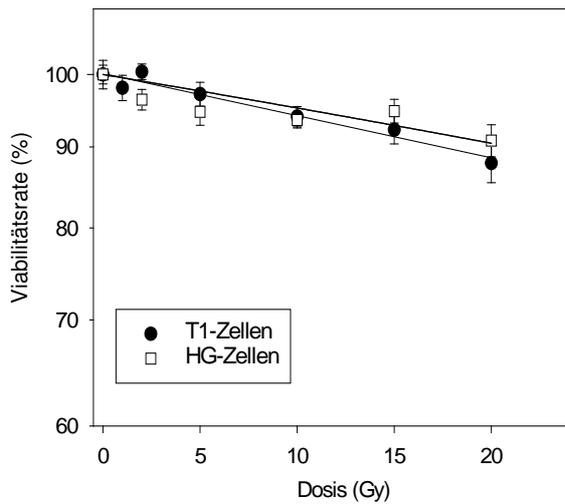


Abbildung 1: Viabilitätsraten der T1- und 86HG-39-Zellen nach ^{137}Cs - γ -Bestrahlung ($n=10$; $\pm\text{SE}$)

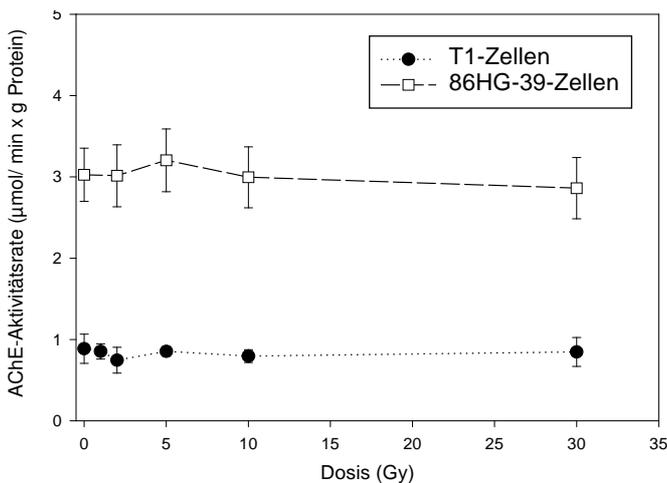


Abbildung 2: AChE-Aktivitätsraten der T1- und 86HG-39-Zellen nach ^{137}Cs - γ -Strahlung (μMol Substrat hydrolysiert pro Minute und g Protein, $n = 10$; $\pm\text{SE}$)

branfluidität, -transport und -lipidperoxidation auch Proteinveränderungen auf, die sich beispielsweise auf die Aktivität membran-gebundener Enzyme beziehen können. Von der Acetylcholinesterase (AChE) existiert eine membrangebundene Form, die extrazellulär durch eine Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Kette verankert ist. Es wurde angenommen, daß eine Bestrahlung von Zellen mit ^{137}Cs - γ zu einer Ablösung (Durchtrennung des GPI-Ankers) der AChE führt, wodurch im

Überstandsmedium Änderungen der Enzymaktivität photometrisch mit der Methode nach [Ell61] nachgewiesen werden können. Bei dieser Methode wird das Substrat Acetylcholiniodid durch die AChE in Choliniodid und Acetat gespalten. Choliniodid bildet nach Zugabe von Ellmans Reagenz ein 'gelbes Anion'. Als Standard für diesen Assay diente membrangebundene AChE aus Rindererythrozyten. Um ausschließlich die Aktivität der membrangebundenen AChE zu erhalten, wurde bei einigen Versuchen Ethopropazin (Fluka) zugesetzt, das die unspezifische Cholinesterase hemmt.

Die Aktivitätsrate (R) der AChE - ausgedrückt als Mol Substrat hydrolysiert pro Minute und Gramm Protein - wurde nach Ellman [Ell61] folgendermaßen berechnet:

$$R = \left[\frac{\Delta E / \text{min}}{1,36 \cdot 10^4 \cdot C_{\text{Prot}}} \right] \cdot F \quad (1)$$

ΔE ergab sich aus Extinktionsmessungen bei 412 nm alle 20 Sekunden.

Es lagen bereits Ergebnisse zur Änderung der Enzymaktivität der AChE bei T1-Zellen nach Bestrahlung mit schweren Teilchen vor [Sha99], deren deutliche Dosisabhängigkeit sich nach entsprechender ^{137}Cs - γ -Exposition aber nicht wiederholen ließ. Abbildung 2 zeigt, dass sowohl T1- als auch HG-Zellen keine Dosisabhängigkeit zwischen 0 und 30 Gy erkennen lassen, unabhängig vom anfänglichen AChE-Gehalt.

Wachstumskurven

Eine charakteristische Größe für das Wachstum von Zellpopulationen ist deren Verdopplungszeit. Für die T1- und 86HG-39-Zellen betrug sie in Leighton-Kulturröhrchen 32 bzw. 30 Stunden, ermittelt aus der exponentiellen Phase (Abb. 3) und berechnet nach folgender Gleichung [McA94]:

$$t_d = \log 2 \cdot \frac{t_1 - t_0}{\log N_1 - \log N_0} \quad (2)$$

t_d = Verdopplungszeit, N_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt t_0 , N_t = Zellzahl zum Zeitpunkt t .

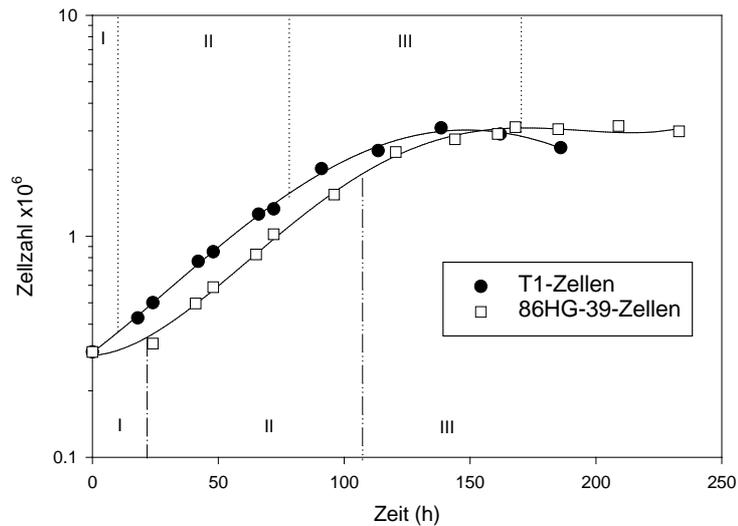


Abbildung 3: Wachstumskurven der T1- und 86HG-39-Zellen mit Phaseneinteilung (I = lag-Phase, II = exponentielle Phase, III = stationäre Phase)

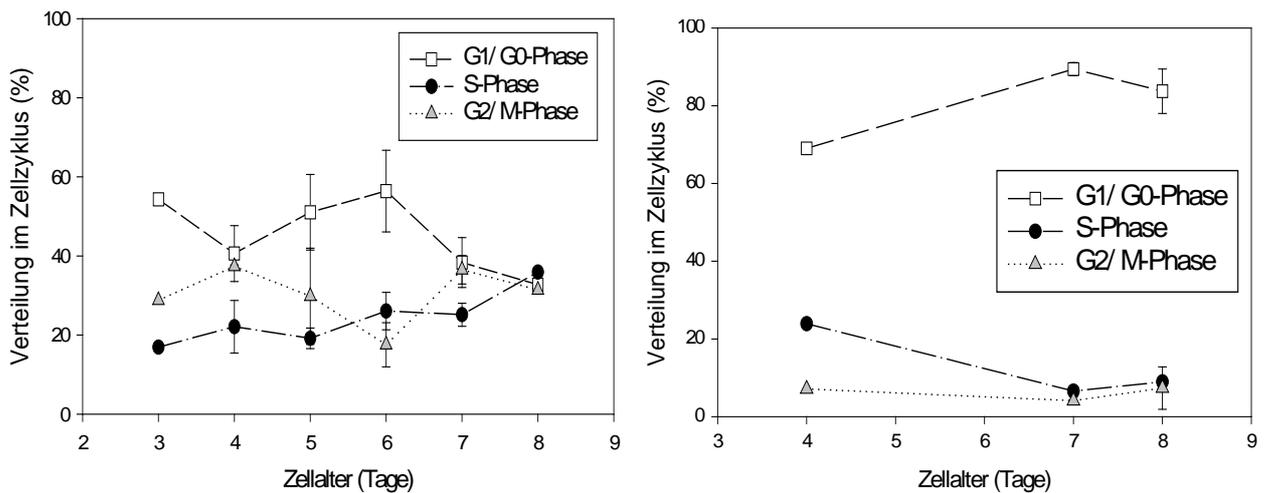


Abbildung 4: Verteilung der Zellzyklusphasen von 3 - 8 Tage alten T1-Zellen (links) bzw. von 4, 7 und 8 Tage alten 86HG-39-Zellen (rechts)

Zellzyklusphasen

Durchflusszytometrische Analysen ergaben die Häufigkeitsverteilungen verschiedener Zyklusphasen. Diese Messungen waren für die spätere optimale Inkorporation von $^{125}\text{IUdR}$ erforderlich, die nur in S-Phase-Zellen erfolgen konnte. Es wurde ein deutlicher Unterschied in der altersabhängigen Zellzyklusverteilung zwischen den T1- und 86HG-39-Zellen gefunden (s. Abb. 4).

Für den Vergleich der Zellzyklusverteilungen wurden die Mittelwerte aus den Messungen 4 und 7 Tage alter Zellen als Beispiele für die ex-

ponentielle und die stationäre Wachstumsphase gegenübergestellt (s. Tab. 1). Von den 86HG-39-Zellen wiesen die 4 Tage alten Zellen mit 23,9 % einen deutlich höheren S-Phase-Gehalt auf als die 7 Tage alten Zellen mit nur 6,6 %. Gleichzeitig stieg der G0/G1-Anteil von 69 % auf 89,4 % an, und der G2/M-Phase-Anteil nahm leicht von 7,1 auf 4,1 % ab. Es ergab sich somit bei den 86HG-39-Zellen eine vom Wachstumsalter der Zellpopulation abhängige Zellzyklusverteilung. Für T1-Zellen konnte diese Zuordnung zu den Wachstumsphasen nicht gefunden werden, da die Zellen trotz unterschiedlichen Alters eine ähnliche Verteilung im Zell-

Tabelle 1: Zellzyklusphasenanteile (%) von T1- und 86HG-39-Zellen nach 4 und 7 Tagen Wachstum in Leighton-Kulturröhrchen (n = 1-3; ± SE)

	Alter	G0/G1-Phase	S-Phase	G2/M-Phase
T1-Zellen	4 Tage	40,6 ± 5,0	22,1 ± 4,7	37,4 ± 0,3
	7 Tage	38,3 ± 5,2	25,1 ± 2,4	36,5 ± 2,9
86HG-39	4 Tage	69,0	23,9	7,1
	7 Tage	89,4 ± 1,4	6,6 ± 0,8	4,1 ± 0,8

zyklus zeigten. Der S-Phase-Anteil nahm bei 7 Tage alten T1-Zellen der stationären Phase von 22,1 % auf 25,1 % zu, während der G1-Phase-Anteil entsprechend von 40,6 auf 38,3 % abnahm. Der G2/M-Phase-Anteil blieb in etwa gleich.

3.2.2 Hauptuntersuchungen

Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest ist eine etablierte Methode, um den zellulären Gesamtschaden nach Strahlenexposition zu bestimmen. T1- und 86HG-39-Zellen ergaben eine sehr unterschiedliche Koloniebildung. Während die sog. plating

efficiency (PE = Anzahl der Kolonien / Anzahl der eingesäten Zellen) für die Kontrollen der T1-Zellen meistens über 90 % lag, erreichten die 86HG-39-Zellen nur eine PE von maximal 30 %. Auch morphologisch differierten die Kolonien der beiden Zell-Linien stark: die T1-Zellen bildeten runde, stark angehäuften und gut färbbare, die 86HG-39-Zellen dagegen schlecht anfärbbare Kolonien von geringer Zelldichte und mit "ausgefranzten" Rändern (Abb. 6).

Die Überlebenskurven der T1- und 86HG-39-Zellen wiesen beide nach ^{137}Cs - γ -Bestrahlung eine typische Niedrig-LET-Form mit einer leichten Schulter im Anfangsbereich auf und fielen dann bis in die 4. bzw. 5. Dekade ab (Abb. 5). Der Kurvenverlauf für die 86HG-39-Zellen zeigte eine etwas breitere Schulter, da die anfängliche Neigung im Vergleich zu den T1-Zellen schwächer ausfiel. Ab einer Dosis von etwa 6 Gy verliefen die Kurven der beiden Zell-Linien im linearen Teil fast parallel. Charakteristische Kurvenparameter sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

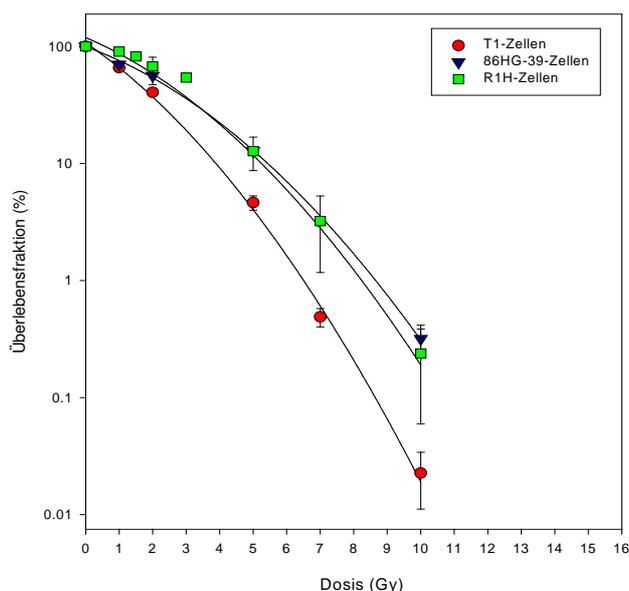


Abbildung 5: Überlebenskurven nach ^{137}Cs - γ -Strahlung der T1- und 86HG-39-Zelle (n = 6 - 9; ±SE), wobei nur Kolonien mit mindestens 50 Zellen ausgewertet wurden

Tabelle 2: Charakteristische Kennzahlen der Überlebenskurven von T1- und 86HG-39-Zellen nach ^{137}Cs - γ -Bestrahlung (SF2: Überlebensfraktion bei 2 Gy)

Kurvenparameter	T1-Zellen	86HG-39-Zellen
D ₀	0,9 Gy	1,2 Gy
D ₃₇	1,6 Gy	2,7 Gy
SF2	40,5 %	51 %

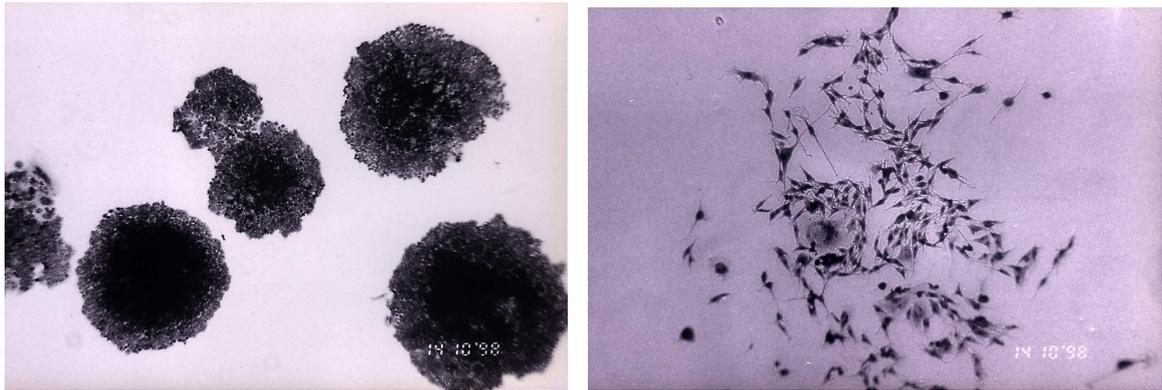


Abbildung 6: T1- (links) und 86HG-39-Kolonien (rechts) nach Hämatoxilin-färbung (Vergrößerung: 40 und 100 x)

COMET-Assay

Diese Methode bietet die Möglichkeit, DNA-Schäden einer einzelnen Zelle nach horizontaler Gelelektrophorese quantitativ zu erfassen. Die hier durchgeführten Untersuchungen basierten auf den Vorschriften von [Oli90] und [Sin88]: Die exponierten Zellen wurden in Agarose auf Mikroskop-Objektträgergläsern eingebettet, bei 4°C für eine Stunde durch NaCl/Tris/Na₂EDTA (pH 10) lysiert, anschließend mit NaOH / Na₂EDTA (pH > 12) für 25 min denaturiert (“unwinding”) und der Elektrophorese (0,8 V/cm, 25 min) unterworfen. Hierbei kam es zu der typischen Kometenbildung des aus der Zelle herauswandernden und geschädigten DNA/Chromatins, das mit Propi-

diumiodid gefärbt wurde (s. Abb. 7). Entsprechend der Intensität der Fluoreszenzfärbung und der Länge der Wanderungstrecke im elektrischen Feld, wurde mit Hilfe einer Kinetik-Software (Komet 3,1; OPTILAS) die Schädigung der einzelnen Zellen analysiert. Als Parameter für das Maß der DNA- bzw. Chromatinschädigung wurde das Olive-Tail-Moment (OTM) ausgewählt, das sich aus dem Produkt des DNA-Anteils im Schweif des Kometen und der Distanz zwischen den Peakmaxima von Kopf und Schweif zusammensetzt [Oli90] (s. Abb. 8):

$$\text{OTM} = d \cdot \text{DNA - Anteil}_{\text{Schweif}} \quad (3)$$

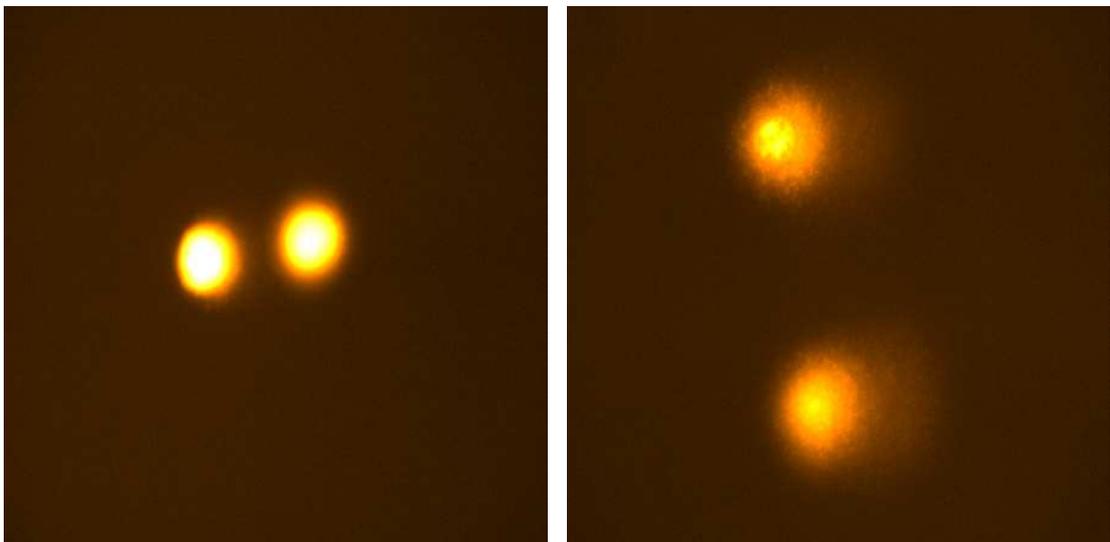


Abbildung 7: Aufnahmen von 86HG-39-Kometen: ohne Bestrahlung (links), nach ¹³⁷Cs-γ-Bestrahlung (rechts)

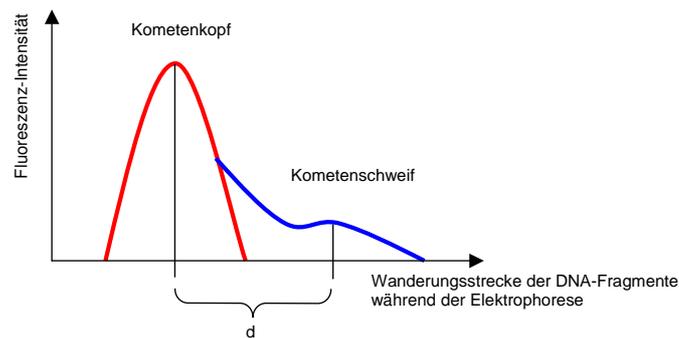


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Kometen mit den Parametern des OTM

DNA-Strangbruchmessung mittels Hydroxylapatit-Chromatographie (HA)

Diese Methode der DNA-Strangbruchmessungen beruht auf der unterschiedlich starken Adsorption von einzel- (es) und doppelsträngigen (ds) DNA-Anteilen nach DNA-Bruchinduktion am Hydroxylapatit-Säulenmaterial (zur Probenvorbereitung siehe Abb. 9).

Die weniger stark adsorbierten es-Anteile werden mit 125 mM Kaliumphosphatpuffer (KPP) und die stärker adsorbierten ds-Anteile mit 250 mM KPP eluiert. Da die zelluläre DNA zuvor mit ^3H -Thymidin ([Methyl- ^3H]-TdR) gleichmäßig über ihr gesamtes Molekül markiert worden war, repräsentieren die gemessenen Aktivitäten der eluierten es- bzw. ds-Anteile deren Konzentrationen, aus denen sich die Anzahl der Strangbrüche errechnen lässt. Die Berechnung der DNA-Fractionen erfolgt

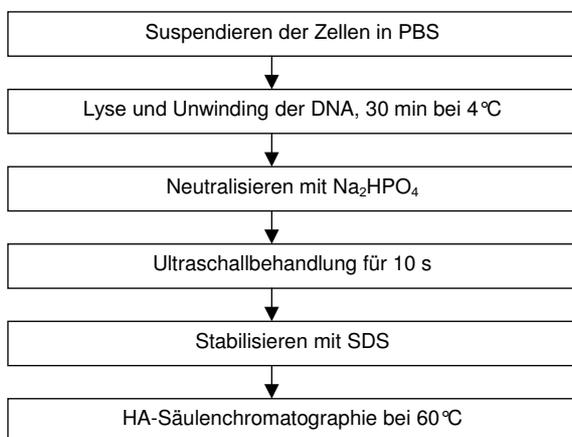


Abbildung 9: Schematischer Ablauf der Probenvorbereitung für die HA-Säulenchromatographie

te nach [Dik98] und ist detailliert beschrieben in [Zer01]. Die ds-DNA-Fraktion stellt die ungeschädigte DNA dar.

Nach ^{137}Cs - γ -Bestrahlung zeigten beide Zelllinien eine signifikant lineare Abnahme der ds-DNA-Fraktion (s. Abb. 10). Die T1-Zellen mit einem Kontrollwert von 74 % wiesen einen stärkeren Abfall als die 86HG-39-Zellen auf. Diese starteten mit einem Kontrollwert von 86 % und zeigten sich bei zunehmender Bestrahlungsdosis weniger sensitiv als T1-Zellen. Bei 10 Gy lag die ds-DNA-Fraktion der T1-Zellen bei 24 %, die der 86HG-39-Zellen dagegen bei 58 %.

Die Analyse der Strangbrüche nach $^{125}\text{IUdR}$ (24 h Doppelmarkierung mit $^{125}\text{IUdR}$ und ^3H -TdR) ergab mit zunehmenden ^{125}I -Zerfällen ei-

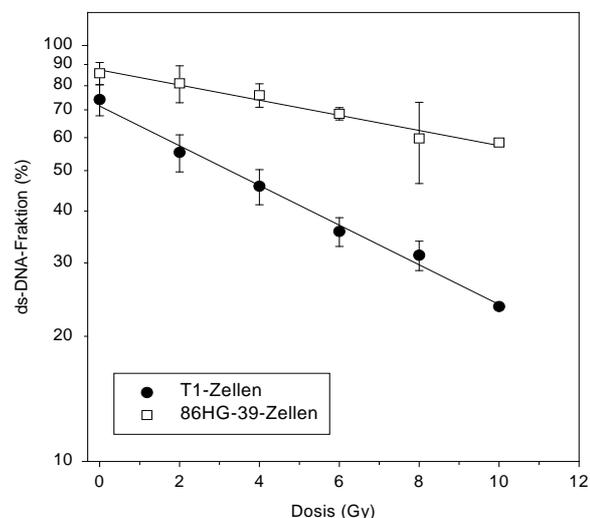


Abbildung 10: HA-Chromatographie nach ^{137}Cs - γ -Bestrahlung der T1- und 86HG-39-Zellen (n=3; \pm SE)

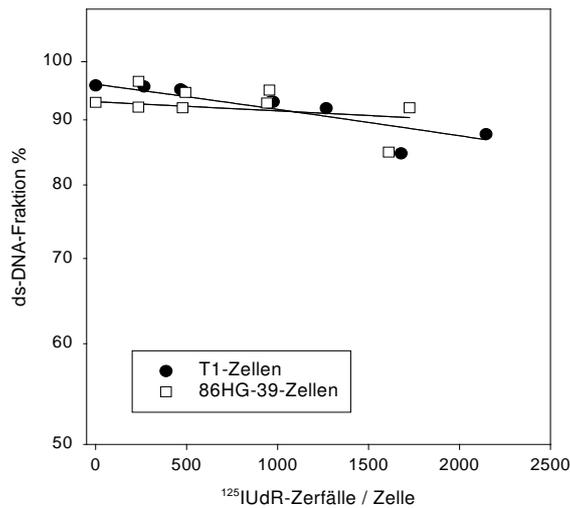


Abbildung 11: HA-Chromatographie nach $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in T1- und 86HG-39-Zellen

ne leichte Abnahme der ds-DNA-Fraktion bei beiden Zell-Linien (s. Abb. 11). Sie sank durchschnittlich bei T1-Zellen von 96 % (Kontrolle) auf 88 % (2200 d/c) und bei HG-Zellen von 93 % (Kontrolle) auf 90 % (1700 d/c). Die HA-Chromatographie eignet sich aufgrund der hier vorliegenden Daten nicht für Strangbruch-Messungen nach Inkorporation von $^{125}\text{IUdR}$ in die DNA. Sie ist offensichtlich viel zu unempfindlich, um selbst die relativ massiven internen Interventionen quantitativ zu detektieren.

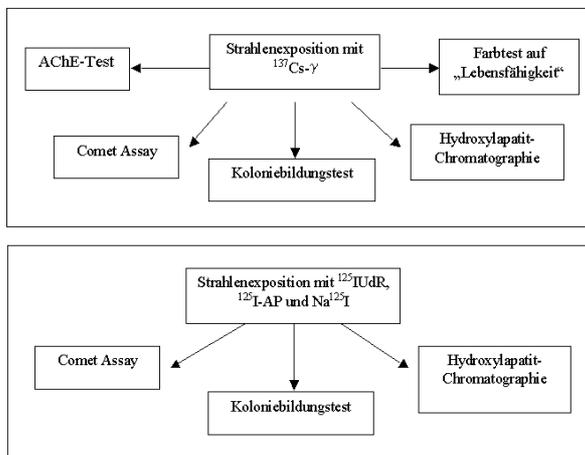


Abbildung 12: Schematische Darstellung der *in-vitro*-Versuche nach Exposition durch ^{137}Cs - γ -Strahlung (oben) und ^{125}I (unten)

^{137}Cs - γ -Expositionen

^{137}Cs - γ -Niedrig-LET-Strahlung diente sowohl als Referenzstrahlung als auch zur Kalibrierung der oben angeführten Methoden, wie z.B. Koloniebildungstest und COMET-Assay. Die Zellen wurden einer mittleren Dosisleistung von 0,9 Gy/min exponiert (Gammacell 40, Atomic Energy Canada): Suspensionen der T1- und 86HG-39-Zellen ($1 \cdot 10^6/\text{ml}$ Medium) wurden auf Eis bestrahlt (0,5 - 20 Gy). Der Transport und die Aufbewahrung bis zum Versuchsbeginn erfolgte ebenfalls auf Eis, um die Versuche reproduzierbar zu gestalten und Reparaturvorgänge in den Zellen zu unterdrücken. Ansonsten waren die Temperaturbedingungen mit denen der ^{125}I -Versuche identisch.

^{125}I iododesoxyuridin-Exposition

^{125}I iododesoxyuridin ($^{125}\text{IUdR}$) ist ein Thymidinanalogon, das anstelle des Thymidins in die DNA proliferierender Zellen eingebaut werden kann. Seine spezifische Aktivität betrug 74 TBq/mmol (2000 Ci/mmol, ICN).

Da $^{125}\text{IUdR}$ nur in die DNA von S-Phase-Zellen inkorporiert wird, wurden für die $^{125}\text{IUdR}$ -Versuche Zellen der exponentiellen Phase (3 Tage alte T1-Zellen und 4 Tage alte 86HG-39-Zellen mit einer Einsaat von $1 \cdot 10^6$ bzw. $0,8 \cdot 10^6$ Zellen in T-25-Flaschen) verwendet. Der Einbau von $^{125}\text{IUdR}$ in die zelluläre DNA wurde sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig und unter Einfluß von 10^{-8}M FUdR (5'-Fluoro-2'-desoxyuridin, Fluka) untersucht, das durch Hemmung der *de-novo*-Pyrimidin-Synthese die Inkorporation von $^{125}\text{IUdR}$ in die DNA förderte. Zur Komplettierung der Basen wurde au-

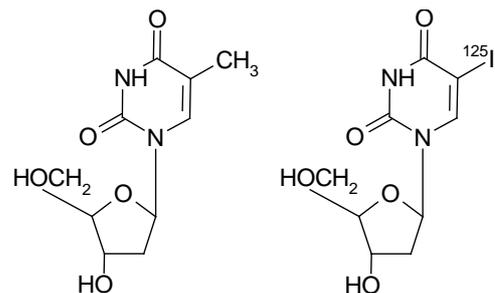


Abbildung 13: Strukturformeln von Thymidin (links) und ^{125}I iododesoxyuridin (rechts)

ßerdem 10^{-8} M CdR (2'-Desoxycytidin, Sigma) zugesetzt. Über einen Zeitraum von 30 h wurde das radioaktive Medium zweimal ausgetauscht, um einer Einbausättigung vorzubeugen, die nach 8-10 Stunden nachgewiesen werden konnte. Die entsprechenden Kontrollen waren mit nicht-radioaktiven Zusätzen an FUdR, CdR und IUdR versetzt. Am Ende der $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition wurden die Zellen abgelöst, gezählt und aliquotiert. Ein Aliquot wurde stets zur Messung der zellulären Aktivität im Gammazähler (BF Gammszint 5300, Berthold) verwendet.

Die Aufnahme des $^{125}\text{IUdR}$ in die Zelle wurde mittels Trichloressigsäure-Präzipitation überprüft [Kas80]. 95 - 98 % der gesamten Radioaktivität der Zellsuspension befanden sich nach mehrmaligen Waschvorgängen in der ausgefällten DNA. Um physiologische Bedingungen einzuhalten, wurden die mehrstündigen ^{125}I -Expositionen der nicht-synchronisierten Zellpopulationen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 -Begasung durchgeführt.

Anzahl der $^{125}\text{IUdR}$ -Zerfälle pro Zelle

Die Zerfälle pro Zelle (d/c) nach $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation wurden folgendermaßen berechnet:

$$d/c = \frac{{}^{125}\text{I} - \text{Impulse pro min} \cdot t_{\text{ink}} \cdot F}{\text{Effizienz} \cdot N_Z} \quad (4)$$

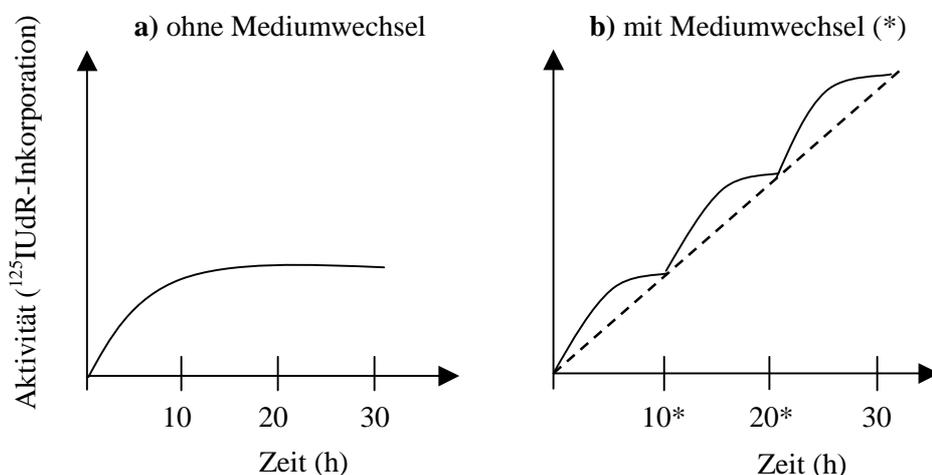


Abbildung 14: Modell der zeitabhängigen $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation mit und ohne Mediumwechsel

t_{ink} : Inkubationsdauer in min (im Falle der $^{125}\text{IUdR}$ -Standardmethode = 1800 min),
 N_Z : Zellzahl, F : Ausgleichsfaktor (0,5), Effizienz = 0,39

Erläuterung zum Ausgleichsfaktor F

Die Messung der Aktivität in den Zellen erfolgte zeitpunktbezogen am Ende der $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporationsperiode und hätte für die gesamte Dauer eine Überschätzung der tatsächlichen Zerfälle pro Zelle dargestellt. Da die Inkorporation ein aktiver und zeitabhängiger Prozeß war, blieb die in den Zellen enthaltene Aktivität über diesen Zeitraum nicht konstant. Die Anzahl der Zerfälle pro Zelle wurde deshalb über einen Ausgleichsfaktor gemittelt. Durch den Mediumwechsel ergab sich eine nahezu lineare Inkorporationsrate (Abb. 14). Aufgrund dieser Linearität konnte ein mittlerer Einbauwert von 50 % abgeschätzt und in der Zerfallsberechnung als Ausgleichsfaktor F (0,5) verwendet werden. Diese Kalkulation ist mit der von [Lib83] verwendeten Methode für die Berechnung von $^{125}\text{IUdR}$ -Zerfällen pro Zelle vergleichbar.

Überprüfung des Einflusses nicht-radioaktiver Zusätze

Kontrollexperimente sollten die toxische Wirkung von FUdR und CdR sowie den chemischen Einfluß des Trägermoleküls IUdR (10^{-12} M; Iodo-2desoxyuridin, Fluka) unter-

suchen. T1- und 86HG-39-Monolayer der exponentiellen Wachstumsphase wurden zu diesem Zweck mit den nicht-radioaktiven Substanzen (10^{-8}M) versetzt (Zugabe entweder einzeln oder in Kombination). Korrespondierend zur $^{125}\text{IUdR}$ -Standardmethode, wurde dieses Medium zweimal ausgetauscht. Es konnte keine negativer Einfluß festgestellt werden.

^{125}I -Antipyrin-Exposition

^{125}I -Antipyrin (^{125}I -AP), ein Dimethyl-iodophenyl-pyrazolin, diffundiert im Gegensatz zur aktiven $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation frei durch die Zellmembran und verteilt sich innerhalb weniger Minuten gleichmäßig in der gesamten Zelle [Tal55], [Tho58]. ^{125}I -AP wurde als Sonderanfertigung der Firma ICN in 0,25 % Na-Bicarbonat mit einer spezifischen Aktivität von 56 - 74 GBq/mmol (1,5 - 2 Ci/mmol) geliefert.

Expositionsverfahren

Jeweils $0,5 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 2 mL Medium unterschiedlicher Konzentrationen (1,8 - 9,3 MBq ^{125}I -AP) suspendiert. Die Kontrolle enthielt eine mittlere Konzentration an nicht-radioaktivem Antipyrin (10^{-7}M , Sigma) und Bicarbonat (0,02 %, Biochrom KG). Ebenso wie bei den $^{125}\text{IUdR}$ -Versuchen wurden die Zellen der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Die radioaktive Zellsuspension wurde für 28 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Anzahl der ^{125}I -AP-Zerfälle pro Zelle

Der Berechnung der ^{125}I -AP-Zerfälle lagen folgende Annahmen zugrunde: (1) ^{125}I -AP verteilt sich homogen in der gesamten Zelle; d.h. intrazellulär und im umgebenden Medium ist die

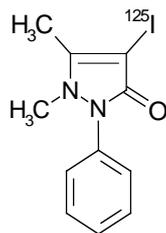


Abbildung 15: Strukturformel von ^{125}I -Antipyrin

^{125}I -AP-Konzentration gleich. (2) Die Verteilung von ^{125}I -AP findet innerhalb weniger Minuten statt, und die Aktivität pro Zelle bleibt dann über den gesamten Inkubationszeitraum konstant. Am Ende der Inkubation wird die Summe der eingetretenen Zerfälle (d) zunächst über die radioaktive Konzentration im Medium und die Zeitkomponente berechnet:

$$d/\mu\text{m}^3 = \frac{A \cdot t_{\text{ink}}}{V_{\text{M}}} \quad (5)$$

A: eingesetzte Aktivität in Bq, t_{ink} : Inkubationsdauer in s (also $28 \cdot 60 \cdot 60$), V_{M} : Volumen des eingesetzten Mediums ($2 \text{ mL} = 2 \cdot 10^{12} \mu\text{m}^3$).

Für die Berechnung der Anzahl der Zerfälle pro Zelle wurde mit dem Zellvolumen multipliziert:

$$d/c = \frac{A \cdot t_{\text{ink}} \cdot V_{\text{Z}}}{V_{\text{M}}} \quad (6)$$

V_{Z} : Zellvolumen (T1-Zellen: $3054 \mu\text{m}^3$, 86HG-39-Zellen: $1770 \mu\text{m}^3$).

Überprüfung des Einflusses nicht-radioaktiven Antipyrins

Eine Inkubation mit 10^{-6} - 10^{-8}M nicht-radioaktiven Antipyrins über einen Zeitraum von 30 h ergab ebenfalls keine Beeinflussung gegenüber den Kontrollversuchen.

Na ^{125}I -Exposition

Die Exposition der T1- und 86HG-39-Monolayer mit extrazellulärem Na ^{125}I erfolgte durch eine 30-stündige Inkubation einschließlich Mediumwechsel, vergleichbar mit der $^{125}\text{IUdR}$ -Standardmethode. Na ^{125}I (in NaOH, pH 10; ICN) wurde auf 1,9 - 15 kBq/mL Medium verdünnt, zu exponentiell wachsenden Zellen gegeben und das Medium während der Inkubation zweimal ausgetauscht. Abschließend wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen, abgelöst und gezählt. Für einen Vergleich mit den ^{125}I -AP-Versuchen wurden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in 2 mL Medium mit Na ^{125}I (1,8 - 9,3 MBq) suspendiert und in Leighton-Kulturröhrchen ausgesät. Die Inkubationsdauer betrug ebenfalls 28 h.

Aktivitätsberechnung

Da das Na^{125}I -Molekül aufgrund seiner Anionenladung und -größe die Zellmembran nicht durchdringen konnte und deshalb extrazellulär verblieb, wurde die Effektivität des Na^{125}I in Einheiten der Aktivitätskonzentration (Bq/mL Medium) anstelle von Zerfällen pro Zelle bestimmt.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Gesamtpopulation und Einzelzell-DNA nach ^{125}I -Exposition

$^{125}\text{IUdR}$

Nach $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation erwiesen sich die 86HG-39-Zellen mit einer D_{37} von 80 Zerfällen/Zelle gegenüber 90 für T1-Zellen als sensitivere Zellpopulation (s. Abb. 16). Der Verlauf der Überlebenskurven zeigte mit ansteigender radioaktiver Exposition bei mehr als 500 ^{125}I -Zerfällen/Zelle Sättigungserscheinungen. Der Überlebensverlauf konnte über höchstens zwei Dekaden der halblogarithmischen Kurve verfolgt werden. Das verdeutlicht die besondere Schadenssituation nach $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition. Die erzeugten Schäden waren offensichtlich so gravierend, daß ab 500 Zerfällen/Zelle die Koloniebildungsfähig-

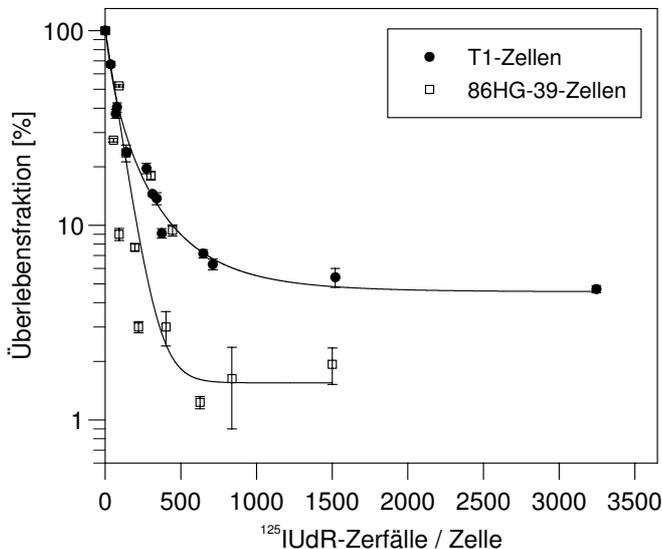


Abbildung 16: Überleben nach $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation

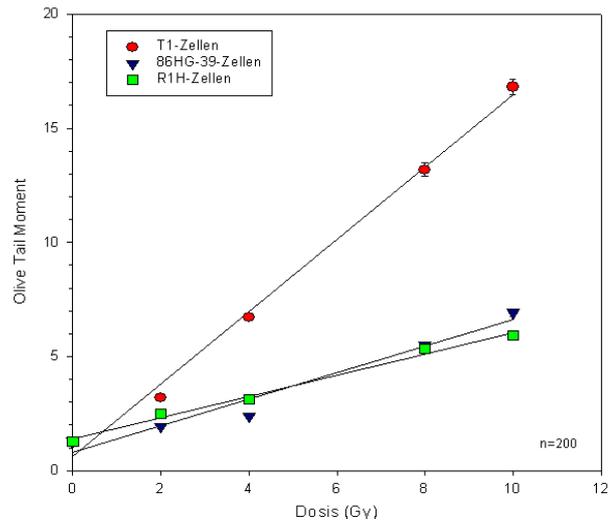


Abbildung 17: COMET-Assay nach ^{137}Cs - γ -Strahlung

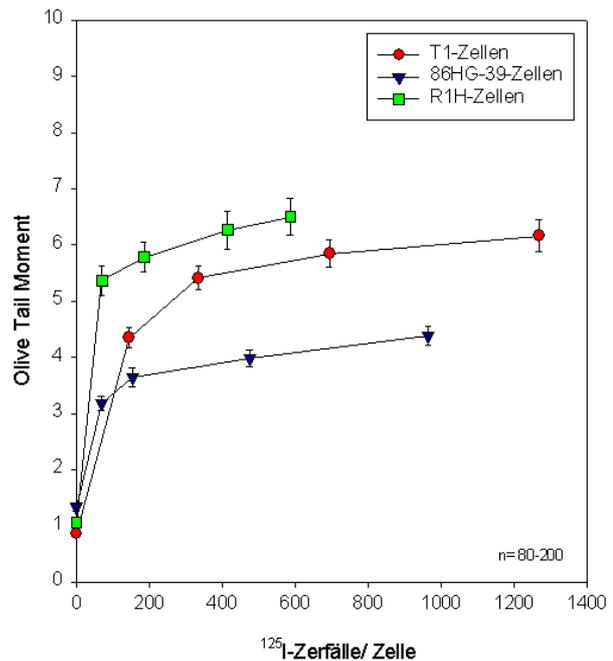


Abbildung 18: COMET-Assay nach $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation

keit nicht mehr signifikant, sondern eher tendenziell abnahm. Weitere Energiedepositionen pro Zelle erzielten keine signifikant zusätzliche Wirkung ("overkill effect").

Eine ähnliche Situation ergab sich mit dem COMET-Assay: während das Olive-Tail-Moment nach ansteigenden γ -Dosen für beide Zell-Linien linear zunahm (T1-Zellen wie

beim Überleben die strahlenempfindlicheren; Abb. 17), erreichte das OTM bei ca. 200 ^{125}I -Zerfällen pro Zelle eine Quasi-Sättigung (Abb. 18). Auch hier war der weitere Anstieg nur tendenziell. Zusätzliche Untersuchungen mit der Ratten-Zelllinie R1H ergaben übereinstimmende Ergebnisse mit 86HG-39-Zellen. Das bestätigt die außerordentliche Schadensbildung durch $^{125}\text{IUdR}$ sowohl bezüglich Überleben als auch bezüglich Chromatinzustand.

^{125}I -AP

Der Koloniebildungstest resultierte bei beiden Zelllinien in schulterförmige Überlebenskurven, die Niedrig-LET-Kurven ähnelten (Abb. 19). Die T1-Zellen wiesen eine etwas ausgeprägtere Schulter auf als die 86HG-39-Zellen, und insgesamt verliefen die Kurven beinahe parallel. Der D_{37} -Wert lag bei T1-Zellen mit 1160 d/c etwas höher als bei 86HG-39-Zellen mit 1130 d/c, die sich somit leicht radiosensitiver zeigten (s. auch Tabn. 10 und 11).

Die Ergebnisse des COMET Assays zeigten sowohl bei den T1- als auch bei den 86HG-39-Zellen einen leichten, linearen Anstieg der OTM-Funktionen mit zunehmenden ^{125}I -AP-Zerfällen pro Zelle (Abb. 20). Die DNA-Schädigung fiel insgesamt bei den T1-Zellen geringfügig stärker aus als bei den 86HG-39-Zellen, da bei 1000 d/c die T1-Zellen durchschnittlich ein OTM von 1,4 erreichten und die 86HG-39-Zellen ein OTM von 1,3.

Na^{125}I

Während die Überlebensfraktion der T1-Zellen mit ansteigender Na^{125}I -Konzentration auf einem Niveau von 90 - 100 % verblieb, sank diejenige der 86HG-39-Zellen bis zu höchsten Konzentration von 15 kBq/mL auf durchschnittlich 75 % (Abb. 21). Dieser Abfall war, im Gegensatz zu den unveränderten Überlebensfraktionen der T1-Zellen, signifikant.

Parallel zum Koloniebildungstest stieg ebenfalls die mit dem COMET Assay gemessene DNA-Schädigung der 86HG-39-Zellen leicht mit zunehmender Na^{125}I -Konzentration an (Abb. 22). Die Unterschiede zur Kontrolle waren überwiegend nicht signifikant. Bei

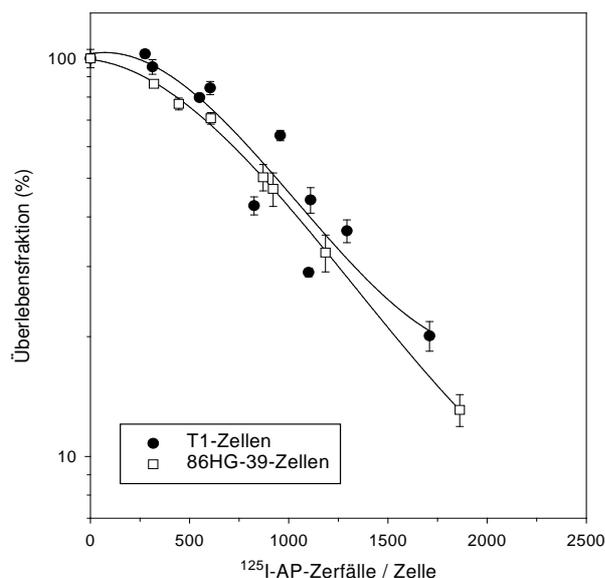


Abbildung 19: Überlebenskurven nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit ^{125}I -AP ($n = 3 \pm \text{SE}$)

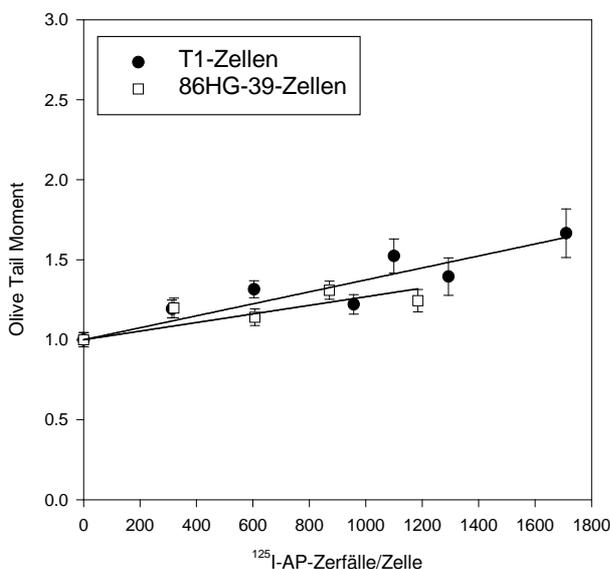


Abbildung 20: COMET-Assay nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit ^{125}I -AP

der höchsten Konzentration (15 kBq/mL) lag ein OTM von durchschnittlich 1,15 vor. Die T1-Zellen zeigten bei ansteigenden Na^{125}I -Konzentrationen keine signifikanten Veränderungen zum Kontrollwert. Die lineare OTM-Funktion schwächte sich stattdessen geringfügig ab.

Wenn also ein zelluläre Beeinträchtigung in Form von DNA-Schädigung oder Beeinflussung

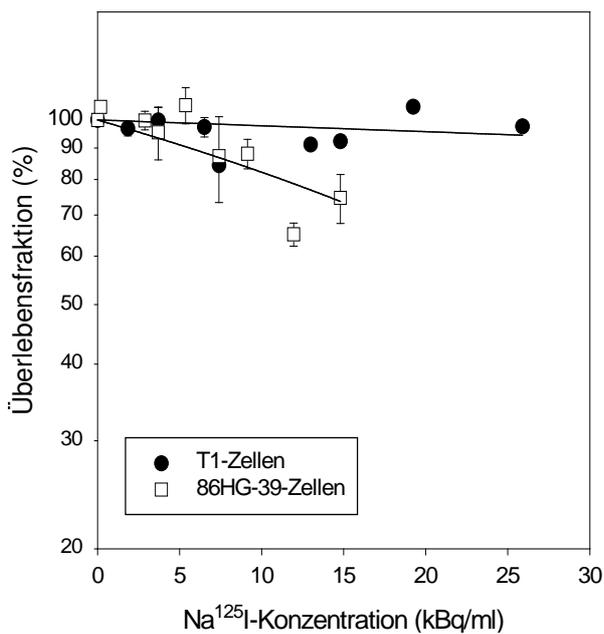


Abbildung 21: Überlebenskurven nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit Na¹²⁵I für 30 h (n = 200 ± SE)

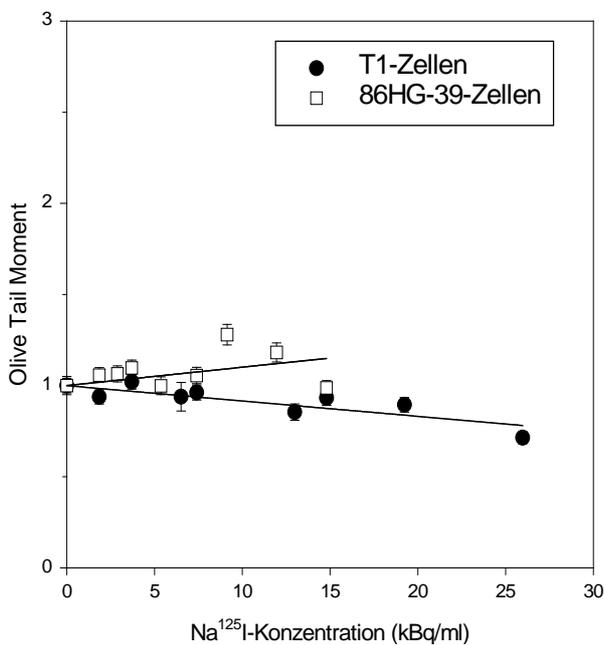


Abbildung 22: COMET-Assay nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit Na¹²⁵I

der Koloniebildungsrate registriert werden sollte, dann ist es nicht auf die kurzreichweitigen Auger-Elektronen zurückzuführen.

3.3.2 Korrelation zwischen Chromatinschäden und Koloniebildungsfähigkeit

Da die Methoden zur Messung von DNA-Schäden einerseits und der Koloniebildungsfähigkeit andererseits sich in Durchführung und Zielsetzung grundlegend unterscheiden, wurde mit einer Korrelationsanalyse eine mögliche Beziehung zwischen den dosisabhängig steigenden DNA-Schäden und der abnehmenden Koloniebildungsfähigkeit untersucht. Dazu wurde der Pearson'sche Maßkorrelationskoeffizient "r" und seine Irrtumswahrscheinlichkeit α [Cla74] für jede Zell-Linie und Strahlenart bzw. Trägermolekül berechnet (s. Tab. 3).

Trotz großer methodischer Unterschiede wurde zwischen beiden biologischen Endpunkten ein enger Zusammenhang gefunden. Für Niedrig-LET-Strahlung im Bereich bis 10 Gy ergab die Korrelation eine lineare Funktion mit einem Korrelationsfaktor von $r = 0,97 - 0,99$ (Abb. 24) sowie mit $r = 0,99$ für ¹²⁵IUdR im Bereich bis ca. 1000 (T1, 86HG-39) bzw. 600 (R1H) Zerfälle/Zelle (Abb. 23).

Diese gute Korrelation deutete sich bereits dadurch an, daß im Falle von ¹²⁵IUdR sowohl die tendenzielle Abnahme als auch die tendenzielle Zunahme des OTM nach Erreichen der Sättigung in ihrem absoluten Betrag vergleichbar waren. Insgesamt weisen die Ergebnisse daraufhin, dass die zelluläre Überlebenssituation sowohl nach γ -Exposition als auch nach Zerfall von DNA-inkorporiertem ¹²⁵I von der Schädigung des Chromatins abhängt.

Nach Exposition mit ¹²⁵I-AP fiel die Korrelation auf Grund weniger Datenpaare (n = 5) nicht signifikant aus. Nach 30 h Inkubation mit Na¹²⁵I ergaben sich keine bzw. nur schwache Korrelationen ($r = 0,0144$ für T1- und $0,355$ für 86HG-39-Zellen).

Angesichts der guten Korrelation zwischen Koloniebildung und Einzelzell-DNA-Schädigung nach ¹²⁵IUdR-Inkorporation ist daraufhinzuweisen, daß es unabdingbar war, Mittelwerte aus einer relativ großen Menge an Einzelergebnissen in Form von OTM-Werten (ca. 200) zu sammeln, da die durch ¹²⁵I-Zerfall erzeug-

Tabelle 3: Korrelationsanalyse zwischen Koloniebildungstest und Comet Assay (mit Pearson'schem Maßkorrelationskoeffizient r und Irrtumswahrscheinlichkeit α). Bewertungskriterien: $r = 1$ ideale Korrelation, $r = 0,8 - 0,99$ starke Korrelation, $r = 0,5 - 0,8$ gute Korrelation, $r = 0,3 - 0,5$ schwache Korrelation, $r < 3$ keine Korrelation.

	T1-Zellen	86HG-39-Zellen	Anzahl der Datenpaare	Bewertung
$^{137}\text{Cs-}\gamma$	$r = -0,998$ ($\alpha \leq 1,63 \cdot 10^{-10}$)	$r = -0,984$ ($\alpha \leq 1,09 \cdot 10^{-5}$)	10 bzw. 8	starke negative Korrelation
$^{125}\text{IUdR}$ (37°C)	$r = -0,748$ ($\alpha \leq 3,28 \cdot 10^{-3}$)	$r = -0,775$ ($\alpha \leq 1,87 \cdot 10^{-3}$)	13	gute negative Korrelation
$^{125}\text{I-AP}$ (37°C)	$r = -0,745$ ($\alpha \leq 0,149$)	$r = -0,724$ ($\alpha \leq 0,167$)	5	gute negative Korrelation, keine Signifikanz!
Na^{125}I	30 h	$r = -0,0144$ ($\alpha \leq 0,971$)	9	keine Korrelation, keine Signifikanz
	28 h	$r = -0,442$ ($\alpha \leq 0,456$)	5	schwache bis gute Korrelation, keine Signifikanz

ten Chromatinschäden in den einzelnen Zellen quantitativ unterschiedlich ausfielen. Die Ursachen hierfür liegen in der unterschiedlichen Menge der jeweils aufgenommenen $^{125}\text{IUdR}$ -Moleküle/Zelle und in den zufallsabhängigen Zerfallsereignissen.

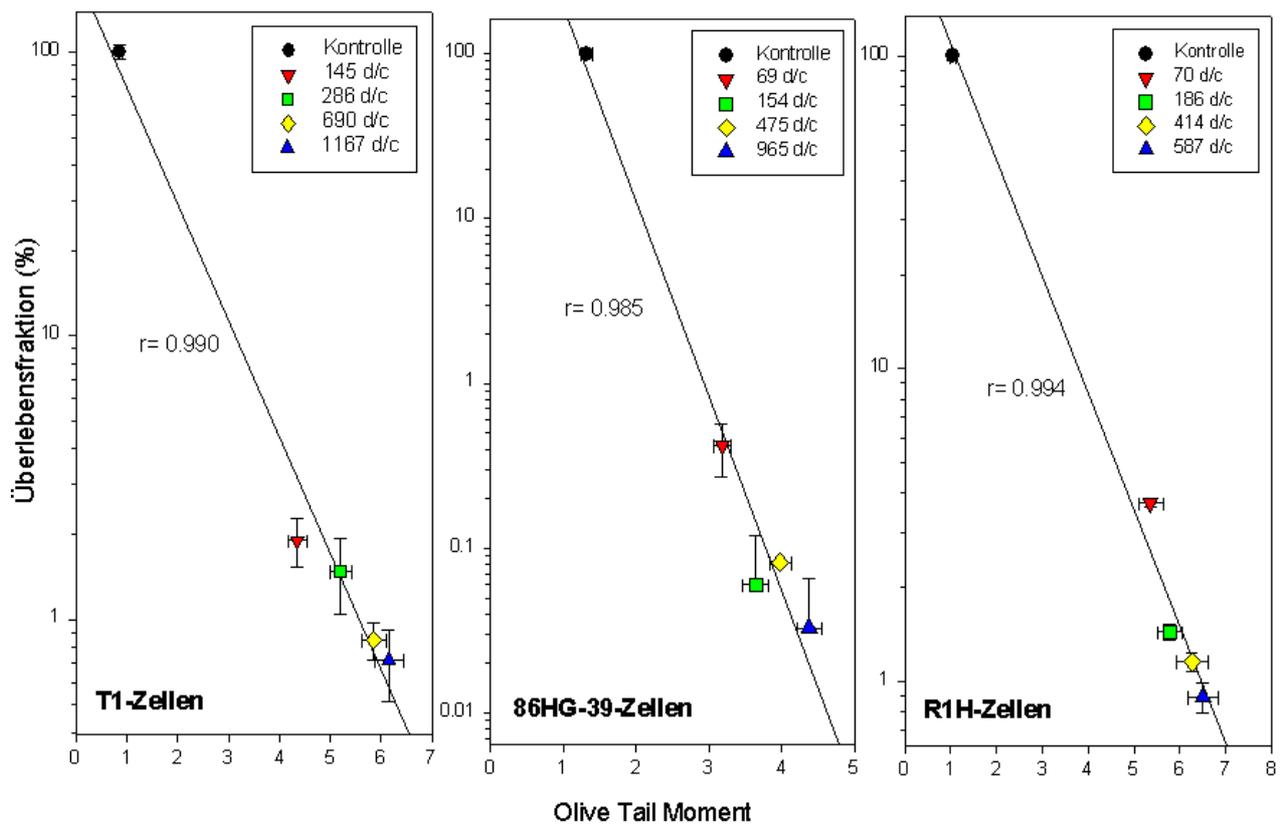


Abbildung 23: Korrelation zwischen Überlebens- und COMET-Assay nach $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation

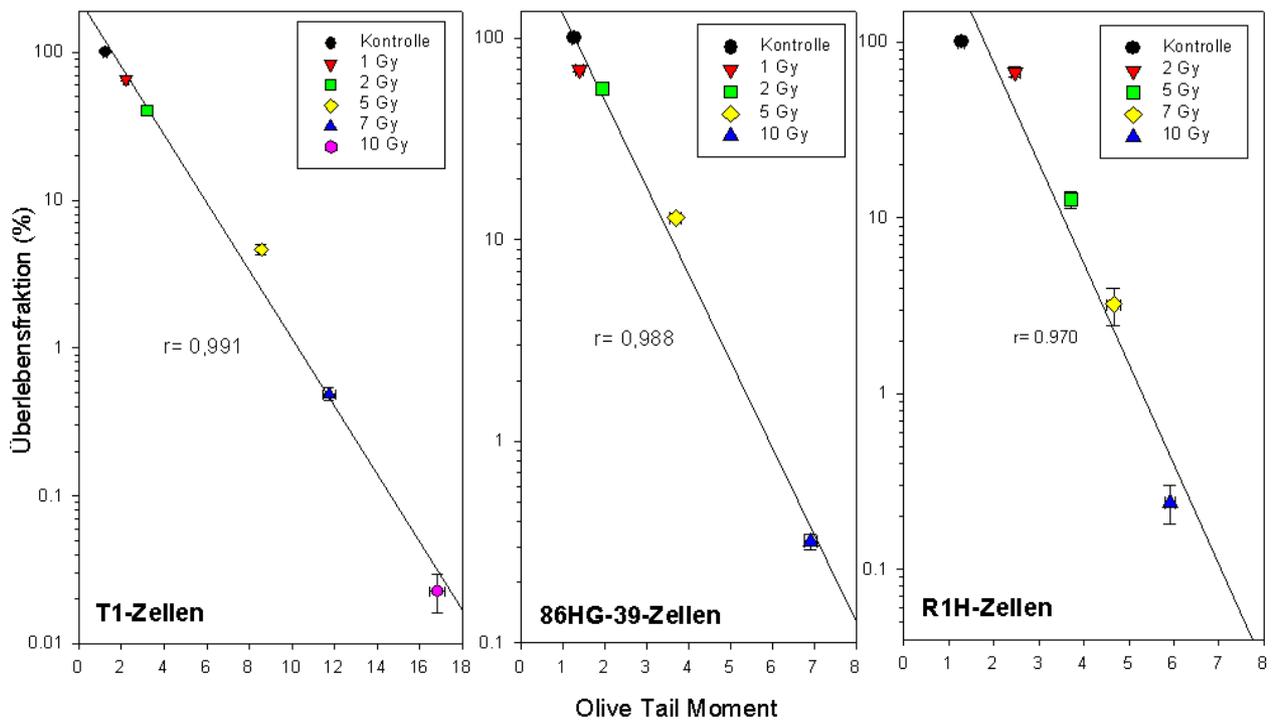


Abbildung 24: Korrelation zwischen Überlebens- und COMET-Assay nach ^{137}Cs - γ -Strahlung

4 Modell-theoretische Untersuchungen

4.1 Einleitung

Um die radiotoxische Wirkung von Auger-Elektronen-Emittern zu verstehen, ist zunächst eine möglichst genaue Kenntnis der Elektronen-Emissionsspektren erforderlich. Dazu müssen die physikalischen Prozesse betrachtet werden, die bei der Reorganisation der Elektronenhülle nach der Induktion einer Fehlstelle in einer inneren Elektronenschale auftreten. Diese Fehlstelle wird durch Elektronen-Einfang oder innere Konversion geschaffen - das auslösende Zerfallsereignis. Die nachfolgenden Reorganisations-Prozesse bestimmen die Emission der Auger-Elektronen und den Ladungsaufbau auf dem Tochternuklid. Die Anregungsenergie infolge der Fehlstelle wird durch eine Reihe von Elektronen- und Strahlungs-Übergängen innerhalb der Schalen abgebaut, die kaskadenartig innerhalb von etwa 10^{-16} bis 10^{-14} s ablaufen. Hier sind die strahlungslosen Auger- und Coster-Kronig-Elektronen-Übergänge zu nennen, die jeweils ein Elektron emittieren und damit die Ladung um eine Einheit erhöhen, sowie die Röntgen-Übergänge. Darüber hinaus wurde eine Reihe weiterer Mechanismen beobachtet, z.B. Shake-off, Shake-up, Doppel-Auger-Emission etc.. Aufgrund des stochastischen Charakters dieser Übergänge gibt es eine große Zahl möglicher Pfade, über die ein so angeregtes Atom zerfallen kann, d.h. jede Fehlstelle in einer inneren Schale kann die Emission unterschiedlich vieler Elektronen und Photonen hervorrufen und somit eine breite Verteilung unterschiedlich stark geladener Ionen zur Folge haben.

Die hier durchgeführten modell-theoretischen Arbeiten umfassen im wesentlichen drei Aspekte: (a) die Generierung von Auger-Elektronen-Spektren mittels Monte-Carlo (MC)-Rechenprogrammen, (b) die Simulation von DNA-Strangbruch-Induktionen aus der Überlagerung von Elektronen-Bahnspuren mit DNA-Target-Modellen und (c) erste Untersuchungen zur Möglichkeit von Coulomb-Explosionen infolge des hohen Ladungspotentials auf dem Tochternuklid.

4.2 Methodik

4.2.1 Generierung von Auger-Elektronen-Spektren

Da die Übergänge innerhalb der Elektronenhülle zufallsgesteuerte Prozesse sind, werden sie mittels Monte-Carlo (MC)-Methode simuliert. Dabei wurden individuelle Nuklid-Zerfälle betrachtet, indem einzelne Auger-Übergänge wie auch Übergänge mit Emission von Röntgenstrahlung anhand ihrer Wahrscheinlichkeiten mittels Zufallszahlen ausgewählt werden. Die so generierten Elektronenspektren dienen als Eingangsdaten für spätere Bahnspurrechnungen, mit denen die Energiedeposition in der Umgebung des Zerfalls bzw. das primäre Spektrum der durch Radiolyse erzeugten Spezies bestimmt werden.

Einzelheiten zum MC-Programm-Code sowie zu dessen Eingangsdaten sind bereits an anderer Stelle detailliert beschrieben [Pom87, Pom00]. Daher sollen hier nur die wichtigsten Aspekte kurz dargestellt werden. Die Elektronenschale für die primäre Fehlstelle wird entsprechend den Photoionisationswirkungsquerschnitten ausgewählt [Sco73, Ban79]. Die nächste Zufallszahl bestimmt den Übergang zu dieser Fehlstelle aus einer Bibliothek möglicher Übergänge: (a) Photonen-Übergänge zur K- und zu L-Schalen (relative Intensitäten [Sto70] normalisiert auf die Fluoreszenz-Ausbeute [Kra79]); (b) Auger- und Coster-Kronig-Übergänge zur K- und zu L-Schalen [Che79] und zu höheren Schalen [McG74]; (c) zusätzlich werden auch Shake-off-Wahrscheinlichkeiten [Car73] berücksichtigt. Alle Übergangswahrscheinlichkeiten gelten für einfach ionisierte Atome. Sie wurden jedoch entsprechend der jeweils aktuellen Anzahl der für einen Übergang verfügbaren Elektronen in den ausgewählten Schalen modifiziert.

Nach jedem Übergang wird die Gesamtenergie des jeweiligen atomaren Zustandes mittels einer relativistischen Dirac-Fock-Methode [Des75] berechnet. Die Differenz zwischen dem neuen und dem alten Zustand ergibt somit die kinetische Energie des emittierten Elektrons. Im Falle eines negativen Wertes ist der Übergang energetisch nicht möglich und wird

verworfen. Als nächstes wird die Fehlstelle in der tiefsten Schale für den folgenden Übergang ausgewählt. Andere Reihenfolgen wurden auch ausgetestet, zeigten jedoch unbefriedigende Ladungsverteilungen im Vergleich zu experimentellen Ergebnisse (Daten werden hier nicht gezeigt).

Zur Validierung der MC-Programme wurden Ladungsverteilungen nach Photoeffekt in Xenon (5,0 und 8,0 keV) sowie der Zerfall von ^{131m}Xe simuliert und mit experimentellen Resultaten aus der Literatur [Car66b, Muk87, Taw92] verglichen. Die so validierten Programm-Codes wurden anschließend für die Simulation der Elektronen-Spektren von Auger-Emittern entsprechend modifiziert.

4.2.2 Bahnspur-Rechnungen

Als DNA-Target zur Simulation von Strangbrüchen wird ein Nukleosomen-Modell (s. Abb. 25) genutzt, das in einer virtuellen Kugel, dem Arbeitsvolumen, von Flüssigwasser umgeben ist. Die Größe dieses Arbeitsvolumens ($r = 12$ nm) wurde empirisch ausgewählt, um zwei Bedingungen zu erfüllen: einerseits sollte es groß genug sein, um alle möglichen Reaktionen zwischen Radikalen und der DNA zu erfassen, und zum anderen klein genug, um das Modell in einer akzeptablen CPU-Zeit handhaben zu können. Das Nukleosom besteht aus einer DNA-Doppel-Helix mit 146 Basenpaaren und 9056 Atomen und umgibt die Histone, die als energieabsorbierend, aber chemisch inaktiv betrachtet werden. Die Koordinaten sowie die Van-der-Waals-Radien aller Nukleosomen-Atome sind bekannt. Details der Berechnungen sind an anderer Stelle veröffentlicht [Pom91].

Die mit MC-Methoden generierten Auger-Elektronen-Kaskaden wurden als Eingangsdaten für einen 4-dimensionalen (x,y,z,t) Elektronentransport genutzt. Die Auger-Emitter-Atome wurden individuell betrachtet, aber gleichförmig auf alle Thymin-Basen des Nukleosomenmodells verteilt, indem sie gegen die Methyl-Gruppen ausgetauscht wurden. Ein kompletter Elektronen-Transport wurde Zerfall für Zerfall simuliert: die physikalische Phase (bis zu 10^{-15} s), die physiko-chemische Phase (10^{-15} bis 10^{-12} s) und die chemische Pha-

se (10^{-12} s bis zu Sekunden) führen zur Entstehung von Radikalen ($e\text{-aq}$, $\text{OH}\cdot$, $\text{H}\cdot$, H_3O^+ , H_2O_2 , OH^- , H_2 , HO_2^-), die diffundieren und untereinander wie auch mit DNA-Einheiten reagieren. Für die Simulation von Strangbrüchen wurden folgende Annahmen getroffen: während der physikalischen Phase wird eine Ionisation innerhalb des Van-der-Waals-Radius eines Phosphat-Gruppen oder Zucker-Atoms (Zeit, Koordinaten und Energiedeposition auf dem Atom) als direkter Einzelstrangbruch (SSB) gespeichert, und das Ereignis wird aus der Anfangsbahnspur gelöscht. Findet zwischen 10^{-15} s und 10^{-8} s, während einer Reaktion mit dem Deoxyribose-Monophosphat, eine Transformation in ein Sub-Produkt statt, so wird ein indirekter Einzelstrangbruch gespeichert (Zeit, Koordinaten und Gesamtenergiedeposition innerhalb des Kugelvolumens durch die Auger-Elektronen des Zerfalls). Doppelstrangbrüche (DSB) sind definiert als zwei Einzelstrangbrüche auf gegenüberliegenden Strängen innerhalb einer Entfernung von bis zu 10 Basenpaaren (für weitere Details s. (Pom94)).

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Auger-Elektronen-Spektren

Die MC-Programme zur Berechnung von Auger-Elektronen-Spektren für individuelle Zerfälle wurden im Verlaufe ihrer Entwicklung kontinuierlich getestet, und die Ergebnisse mit experimentellen Daten aus der Literatur verglichen. Dort liegen insbesondere Ladungsverteilungen nach photonen-induzierten Auger-Elektronen-Kaskaden in Edelgasen vor, ebenso Ladungsverteilungen nach Zerfall von ^{131m}Xe (s. Abb. 26). Im folgenden wird zunächst über die Validierung der MC-Programme anhand dieser Literaturdaten berichtet. Anschließend werden die mit diesen Programmen generierten Emissions-Spektren der Nuklide ^{99m}Tc , ^{123}I und ^{125}I vorgestellt.

Programm-Validierung

Aufgrund der fortgeschrittenen Leistungsstärke moderner Rechner konnten die vorhandenen MC-Programme zunächst so modifiziert werden, dass auf ein bisher verwendetes Nähe-

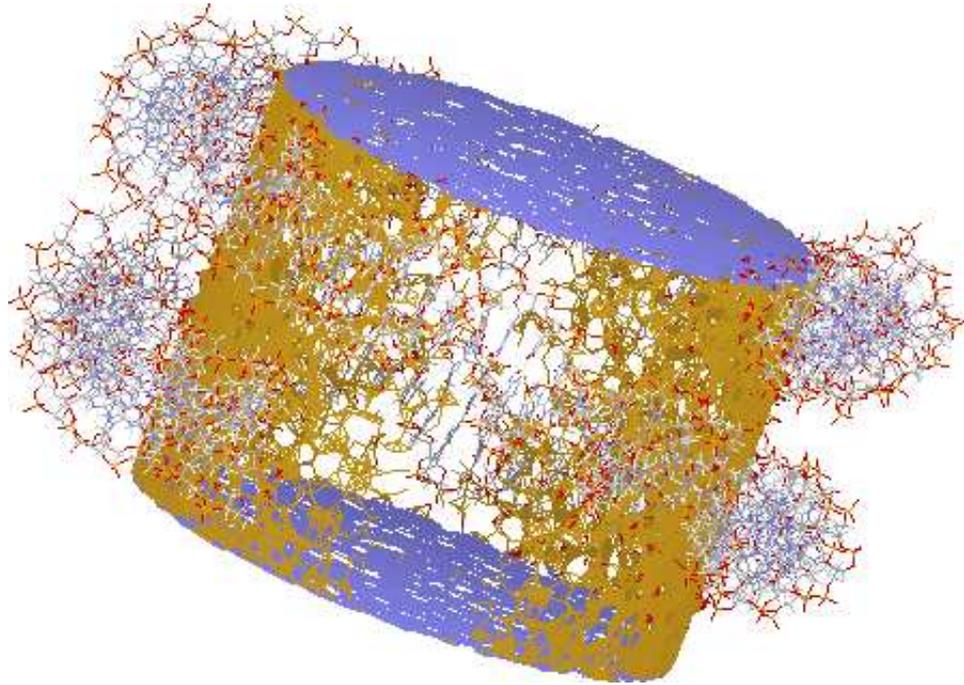


Abbildung 25: Nukleosomen-Modell zur Simulation von DNA-Strangbrüchen [Vri00]

rungsverfahren [Pom87] zur Bestimmung einzelner Energieniveaus jetzt verzichtet werden kann. Damit entfallen zukünftig umfangreiche rechentechnische Vorbereitungs- und Anpassungsarbeiten, und es wird ein zusätzlicher Gewinn an Genauigkeit erzielt. Die Verifizierung der Programme soll hier zuerst über die Simulation des ^{131m}Xe -Zerfalls und anschließend über die Photoionisation stabiler Xenon-Atome dargestellt werden.

^{131m}Xe

Die berechneten Ionisationsverteilungen nach Zerfall von ^{131m}Xe zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit entsprechenden experimentell ermittelten Daten (s. Abb. 27) mit nur sehr leichten Abweichungen, deren größte etwa 1,5

% bei Xe^{12+} beträgt. Im Vergleich zu einer anderen theoretischen Verteilung [Muk86] können die Unterschiede (s. Abb. 27 und Tab. 4) im wesentlichen den jeweils unterschiedlichen Verteilungen der Primärfehlstellen zugeschrieben werden. Mit einer Häufigkeit von 2,2 % [Ple57] bzw. 1,9 % [ICR83] tritt γ -Emission auf, die zu keinem ionisierten Tochteratom führt, anstelle von innerer Konversion, die zur Induktion einer Fehlstelle in einer inneren Schale führt. Diese Werte wurden in dieser Arbeit berücksichtigt, während γ -Emission in [Muk86] komplett vernachlässigt wurde. Die mittleren Ladungszahlen in Spalte 3 der Tab. 4 wurden für diese neutralen Tochteratome korrigiert. Die verbleibenden Unterschiede zwischen dieser Arbeit und [Muk86] sind vermutlich auf die

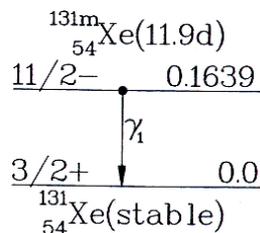


Abbildung 26: Zerfallsschema ^{131m}Xe

Tabelle 4: Mittlere Ladungszahl nach ^{131m}Xe -Zerfall (s. auch [Pom00])

Referenzen	Inklusive Neutrale	Exklusive Neutrale
Experiment [Ple57]	7.73 ± 0.05	7.91 ± 0.05
MC [diese Arbeit]	7.81	7.96
MC [Muk86]		8.37

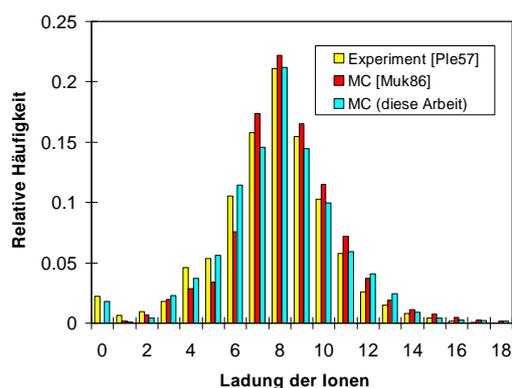


Abbildung 27: Ladungsverteilung nach Zerfall von ^{131m}Xe (s. auch [Pom00])

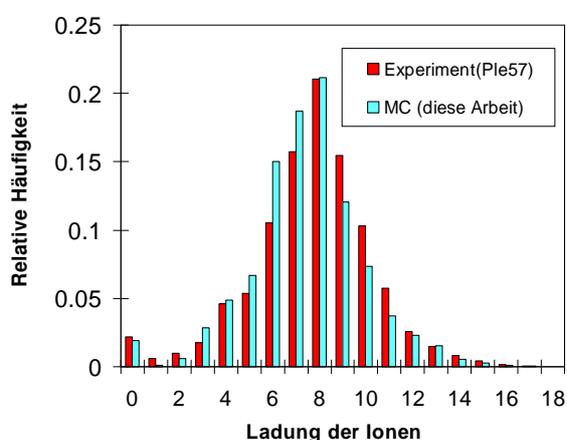


Abbildung 28: Ladungsverteilung nach Zerfall von ^{131m}Xe ohne Berücksichtigung von Shake-Off-Elektronen (s. auch [Pom00])

unterschiedlichen Ansätze zur Energieberechnung zurückzuführen. Dieser Punkt kann jedoch nicht vollständig geklärt werden, da hierzu keine Details in [Muk86] angegeben werden.

Die Ladungsverteilung nach ^{131m}Xe -Zerfall ähnelt derjenigen nach Photoionisation der L-Schale, insbesondere in dem Gebiet um den Maximalwert (Xe^{8+}). Der Grund hierfür liegt in der hohen relativen Wahrscheinlichkeit für Strahlungsübergänge zur K-Schale (0,893 [Che79]), die die initiale K-Fehlstelle ohne Ladungsanstieg zur L- oder zu höheren Schalen verschiebt. Die bessere Übereinstimmung mit den ^{131m}Xe -Experimenten im Vergleich mit der Photoionisation von L-Schalen zeigt, daß die Unterschiede in Abbildung 27 nicht aus der Kaskaden-Simulation resultieren, sondern aus

ungenauen Anfangsverteilungen der Fehlstellen.

Die Notwendigkeit, auch den Einfluß von Shake-off-Elektronen bei den Kaskaden zu berücksichtigen, wird aus Abbildung 28 deutlich. Hier werden die experimentellen Ergebnisse mit einer modifizierten MC-Simulation verglichen, die Shake-off-Prozesse vernachlässigt. Der Einfluß dieser Elektronen auf die Form der Ladungsverteilungskurve ist offensichtlich. Die Übereinstimmung mit dem Experiment wird schlechter mit Differenzen von 4,5 % (+6), 3,0 % (+7), 3,4 (+9), und 3,0 % (+10). Obwohl diese Elektronen weniger als 10 % aller während des isomeren ^{131m}Xe -Übergangs (0,67 Shake-off-Elektronen pro Übergang) emittierten Elektronen ausmachen, spielen sie offensichtlich eine sehr sensitive Rolle in Hinblick auf den stochastischen Pfad, über den die Deexcitation stattfindet von der Fehlstelle in einer inneren Schale bis zu dem Zustand, in dem alle Ladungen in die Valenz-Schalen transferiert worden sind.

Xenon

Hier wurden drei verschiedene Experimente simuliert: Photoionisation durch Synchrotron-Strahlung [Muk87], [Taw92] und durch Röntgenstrahlung [Car66b] mit Energien von 5,0 and 8,0 keV, die oberhalb der L_3 - bzw. der L_1 -Schale liegen. Während die Ergebnisse aus der Synchrotron-Strahlung für beide Energien nahezu identisch sind, weichen die Röntgenstrahlen-Daten leicht ab in Richtung kleinerer Ladungen aufgrund ihres nicht-monochromatischen Photonen-Spektrums. Dies zeigt sich durch eine leichte Verschiebung in den Mittelwerten der Ladung von 7,3 [Muk87] gegenüber 6,95 [Car66b] für die 5,0 keV Photonen und 7,97 [Muk87] gegenüber 7,59 [Car66b] für 8,0 keV. Die hier gefundene MC-simulierte Ionenverteilung (s. Abb. 29) stimmt sehr gut mit den experimentellen Resultaten überein. Die Verteilungsbreite und die Lage des Maximums (Xe^{8+}) sind gleich für beide Photonen-Energien. Verglichen mit [Muk87] und [Taw92] ergeben sich die größten Abweichungen für Xe^{6+} (2,0 % bzw. 3,3 % Differenz für 5,0 keV und 8,0 keV) und für Xe^{9+} (4,0 % und 4,3 %). Obwohl die MC-Resultate unter der

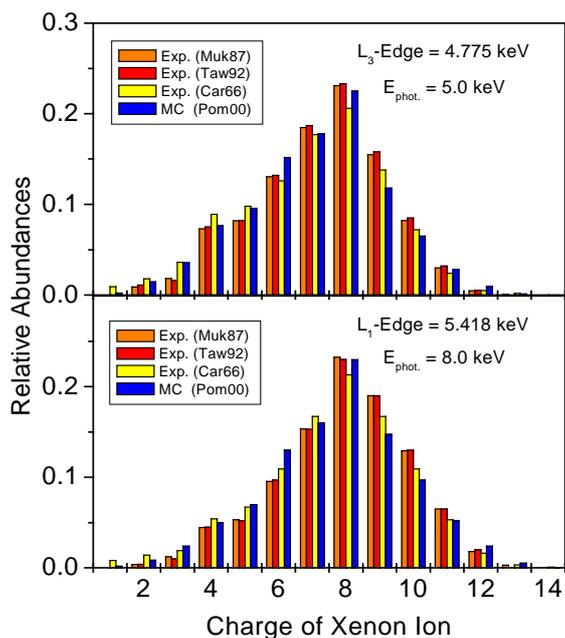


Abbildung 29: Ladungsverteilung nach Photoeffekt in Xenon (s. auch[Pom00])

Annahme monochromatisch einfallender Photonen erzielt wurden, ist die Übereinstimmung mit den Röntgenstrahlen-Ergebnissen sogar besser als mit denen für Synchrotron-Strahlung. Die größten Unterschiede gegenüber [Car66b] bestehen bei Xe^{6+} (2,5 % im 5,0 keV- und 2,1 % im 8,0 keV-Experiment) und bei Xe^{9+} (2,0 % für beide Energien). Eine leichte Überschätzung aller Ladungswerte unterhalb des Maximums (8+) korrespondiert mit einer Unterschätzung höherer Ladungswerte.

Generell ist festzustellen, daß es eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den experimentellen Daten und den MC-Simulationen gibt, und zwar sowohl für den Zerfall von ^{131m}Xe wie auch für die photonen-induzierten Auger-Kaskaden in stabilem Xenon. Die Breite der Ladungsverteilungen und die Positionen der Maxima sind in jeder Simulation identisch mit dem jeweiligen Experiment. Diese gute Übereinstimmung ist ein starker Hinweis darauf, daß die Simulation der Kaskaden, d.h. die Übergänge und ihre Wahrscheinlichkeiten sinnvoll gewählt und die Energien "vernünftig" berechnet und daß darüber hinaus alle signifikanten Prozesse berücksichtigt worden sind.

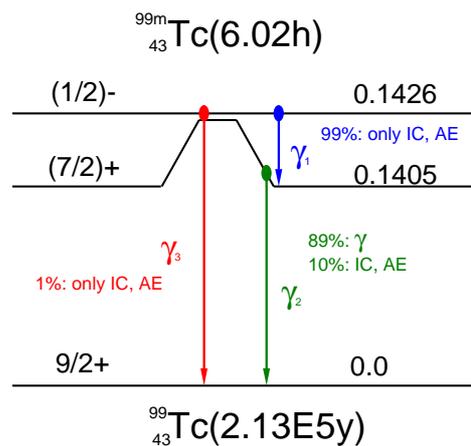


Abbildung 30: Zerfallsschema ^{99m}Tc

Auger-Elektronen emittierende Nuklide

^{99m}Tc

^{99m}Tc ist ein in der diagnostischen Nuklearmedizin häufig genutztes Radionuklid, weil es zusätzlich zu seiner günstigen Halbwertszeit ($T_{1/2} = 6,01$ h) als reiner Gamma-Emitter (140,5 keV) angesehen wird. Der Übergang vom metastabilen zum Grundzustand schließt jedoch einen inneren Konversionsprozeß ein (s. Abb. 30), der zur Emission von Auger- und Konversionselektronen führt. Die mittels MC-Simulation generierten Elektronen-Emissionsspektren zeigen, daß im Mittel 4 Elektronen pro ^{99m}Tc -Zerfall emittiert werden (s. Tabn. 5 und 6, Abb. 31). Das Emissionsspektrum (Abb. 32) läßt sich in drei unterschiedliche Energieregionen un-

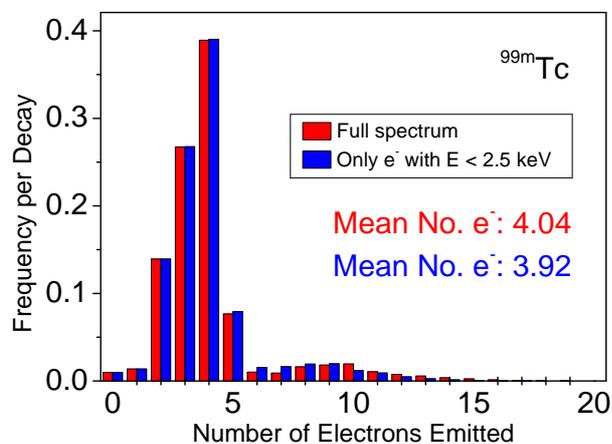


Abbildung 31: Häufigkeitsverteilung emittierter Elektronen pro ^{99m}Tc -Zerfall

Tabelle 5: Ausbeute pro ^{99m}Tc -Zerfall

	Diese Arbeit	[How92]
Auger-, CK-Elektronen	2,5	4,0
Konversions-elektronen	1,1	1,1
Shake-off-Elektronen	0,5	–
γ -Strahlen	0,89	0,89
Röntgenstrahlung	0,07	0,08

Tabelle 6: Emittierte Energien pro ^{99m}Tc -Zerfall in keV

	Diese Arbeit	[How92]
Gesamtenergie	142,605	142,646
Auger-, CK-Elektronen	0,756	0,899
Konversions-elektronen	13,85	15,383
γ -Strahlung	125,07	125,0
Röntgenstrahlung	1,226	1,367

terteilen: > 100 keV: Konversionselektronen (IC, ähnlich reinen β -Emittern, Niedrig-LET-Strahlung); $> 10 < 20$ keV: vernachlässigbar aufgrund der geringen Ausbeute; < 4 keV (siehe Ausschnitt in Abb. 32): vergleichbar der ultra-weichen Röntgenstrahlung, insbesondere der Kohlenstoff-K-Strahlung (dieser Teil des Spektrums wurde mit dem Nukleosomen-Modell detaillierter untersucht, s. auch Abb. 37).

^{123}I

Neben ^{125}I stellt ^{123}I ein besonders interessantes Nuklid für die Strahlenbiologie dar. Zum einen besitzt es eine wesentlich kürzere Halbwertszeit (13.2 h) als ^{125}I (60.1 d), zum anderen erlaubt ein Vergleich von ^{123}I - und ^{125}I -induzierten Schäden bei gleicher Chemie und gleichem Element der jeweiligen Tochternuklide besondere Aussagen hinsichtlich der Schadensmechanismen. Das Zerfallsschema (Abb. 34) er-

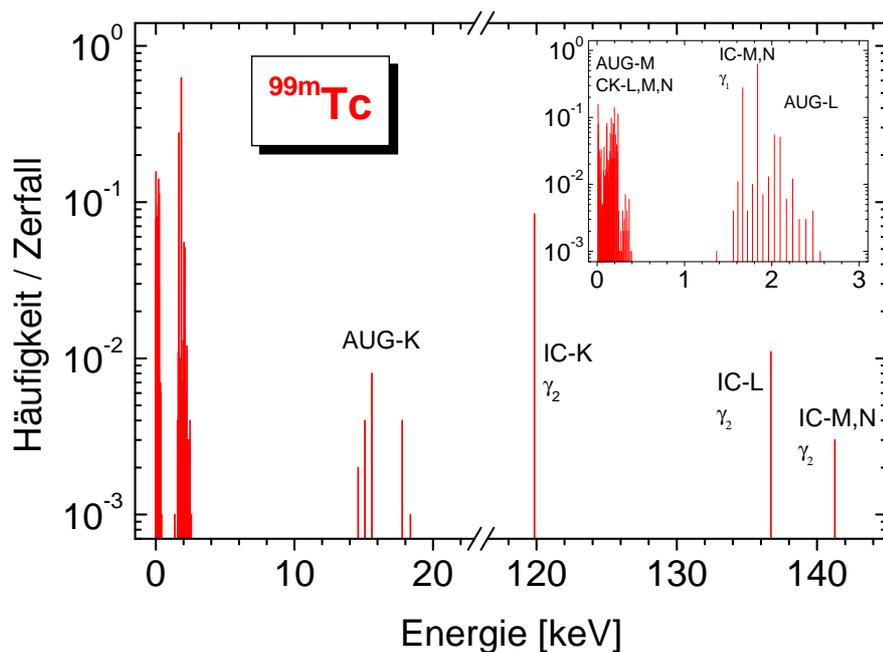


Abbildung 32: Mittleres Elektronenspektrum für 10000 ^{99m}Tc -Zerfälle (berechnet mit MC-Simulationen)

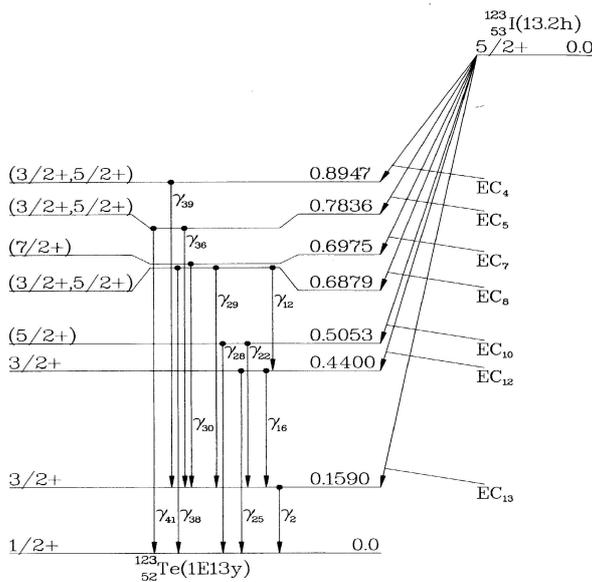


Abbildung 34: Zerfallsschema ^{123}I nach [ICR83]

scheint sehr viel komplexer als dasjenige von ^{125}I (Abb. 35), weil der Elektronen-Einfang-Prozess (100 %) zu verschiedenen angeregten ^{123}Te -Zuständen in Abhängigkeit von den Verzweungsverhältnissen führen kann. Das Nuklid zerfällt aber fast ausschließlich (>97 %) über das 159 keV-Niveau und anschließend entweder unter Gamma-Emission (84 %) oder über innere Konversion in den Grundzustand. Da also nur knapp 16 % der Zerfälle zu innerer Kon-

version führen, kommt es auch nur in diesen Fällen zu zwei Auger-Kaskaden pro Zerfall im Gegensatz zu 93 % bei ^{125}I .

Ein Vergleich der hier berechneten Mittelwerte für Elektronen-Häufigkeiten und -Energien pro ^{123}I -Zerfall (s. Abb. 33 und Tab. 7) mit solchen auf Basis der (Z+1)-Näherung ermittelten [ICR83] zeigt folgendes Bild: während die Energie-Unterschiede für Auger-Elektronen aus Übergängen zur K-Schale kleiner als 1% und solche zur L-Schale kleiner als 5% sind, beträgt die kinetische Energie für Auger-Elektronen aus Übergängen zu höheren Schalen ungefähr 55 % der korrespondierenden ICRP-Werte (MXY-Übergänge). Coster-Kronig-Elektronen wie auch N-Schalen-Auger-Elektronen und Shake-off-Elektronen sind in [ICR83] nicht aufgeführt.

^{125}I

^{125}I zerfällt zunächst über Elektronen-Einfang und anschließend zu 93 % über innere Konversion in den stabilen ^{125}Te -Grundzustand (Abb. 35). Der Elektronen-Einfang, bei dem ein Orbital-Elektron vom Kern absorbiert wird, führt unter Emission eines Neutrinos zu einem angeregten metastabilen ^{125m}Te -Zustand. Das Atom ist neutral mit einer Fehlstelle in

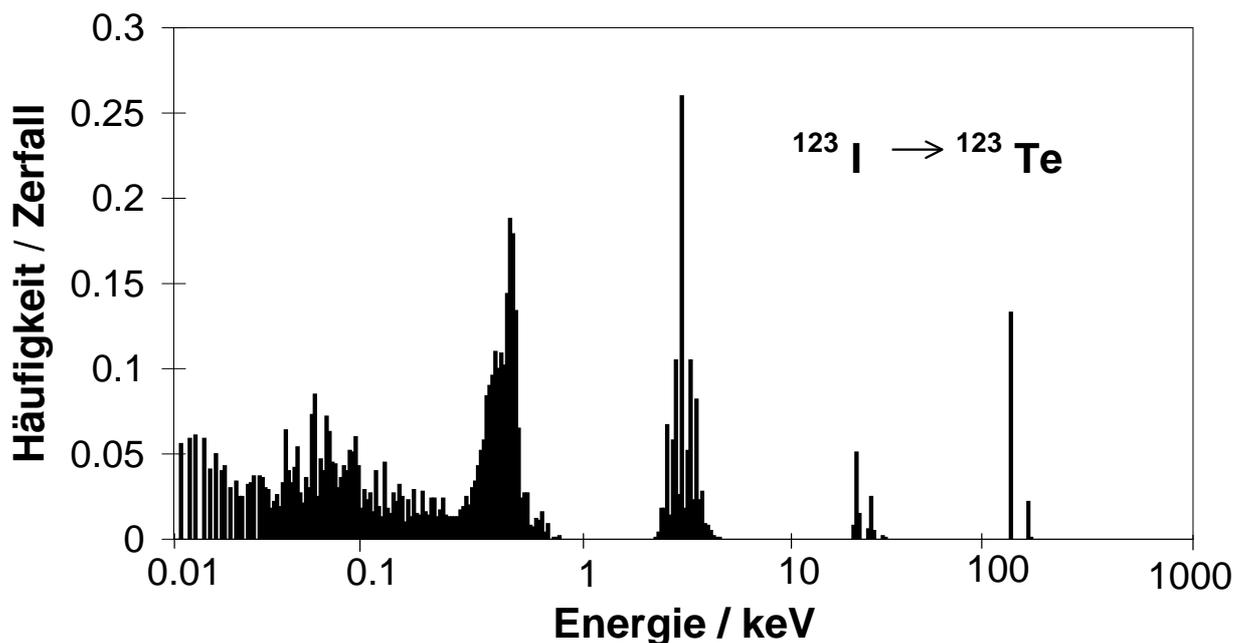


Abbildung 33: Mittleres Elektronenspektrum für ^{123}I -Zerfälle (berechnet mit MC-Simulation)

einer der inneren Elektronenschalen und besitzt eine Energie, die der Bindungsenergie der Fehlstellen-Schale entspricht. Der Übergang vom metastabilen Niveau (35,4 keV) in den Grundzustand verläuft zu 93 % über innere Konversion bzw. zu 9 % über Gamma-Emission.

Für molekular gebundenes ^{125}I in Form von $^{125}\text{IUdR}$ kann die Situation sehr viel komplexer sein als für ein isoliertes Isotop. Wie bereits in der Einleitung diskutiert, beeinflusst die Frage eines möglichen Ladungstransfers zur Neutralisation der Fehlstellen die Anzahl der emittierten Elektronen sehr stark [Cha81]. In der hier durchgeführten Simulation werden generell alle Fehlstellen während des metastabilen ^{125}Te -Zustandes ($1.6 \cdot 10^{-9}$ s) neutralisiert. Darüber

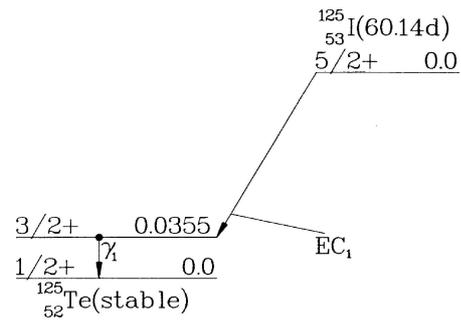


Abbildung 35: Zerfallsschema ^{125}I nach [ICR83]

hinaus wird zwischen 'Kondensierter Phase' und 'Isoliertem Atom' unterschieden. Im ersten Fall werden Valenzschalen-Fehlstellen unmittelbar neutralisiert, während im Falle des isolierten Atoms dieser schnelle Ladungstrans-

Tabelle 7: Häufigkeiten und Energien der der Konversions (CE)-, Auger (AUG)- und Coster-Kronig (CK)-Elektronen pro ^{123}I -Zerfall

Übergang	Häufigkeit [diese Arbeit]	Häufigkeit [ICR83]	Mittlere Energie (keV) [diese Arbeit]	Mittlere Energie (keV) [ICR83]
CE-K	1.32E-01	1.35E-01	1.27E+02	1.27E+02
CE-L1	1.56E-02	1.60E-02	1.54E+02	1.54E+02
CE-L2	9.80E-04	1.09E-03	1.54E+02	1.54E+02
CE-L3	2.60E-04	3.46E-04	1.55E+02	1.55E+02
CE-M1	3.17E-03	3.46E-03	1.58E+02	1.58E+02
CE-N1	9.40E-04	8.27E-04	1.59E+02	1.59E+02
AUG-KLL	7.91E-02	8.15E-02	2.25E+01	2.25E+01
AUG-KLX	3.28E-02	3.69E-02	2.64E+01	2.64E+01
AUG-KXY	2.94E-03	4.92E-03	3.02E+01	3.01E+01
CK-LLX	1.43E-01		2.80E-01	
AUG-LMM	7.19E-01	6.06E-01	3.03E+00	3.08E+00
AUG-LMX	1.99E-01	3.11E-01	3.66E+00	3.85E+00
AUG-LXY	1.29E-02	4.40E-02	4.29E+00	4.38E+00
CK-MMX	8.78E-01		9.41E-02	
AUG-MXY	1.94E+00	1.80E+00	4.05E-01	6.99E-01
CK-NNX	1.94E+00		3.13E-02	
AUG-NXY	1.58E+00		1.85E-02	

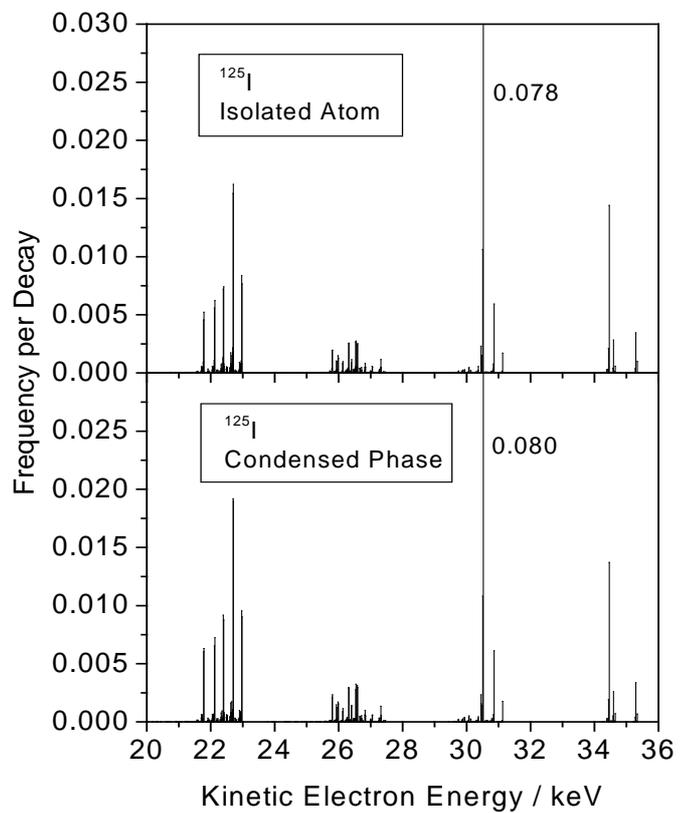
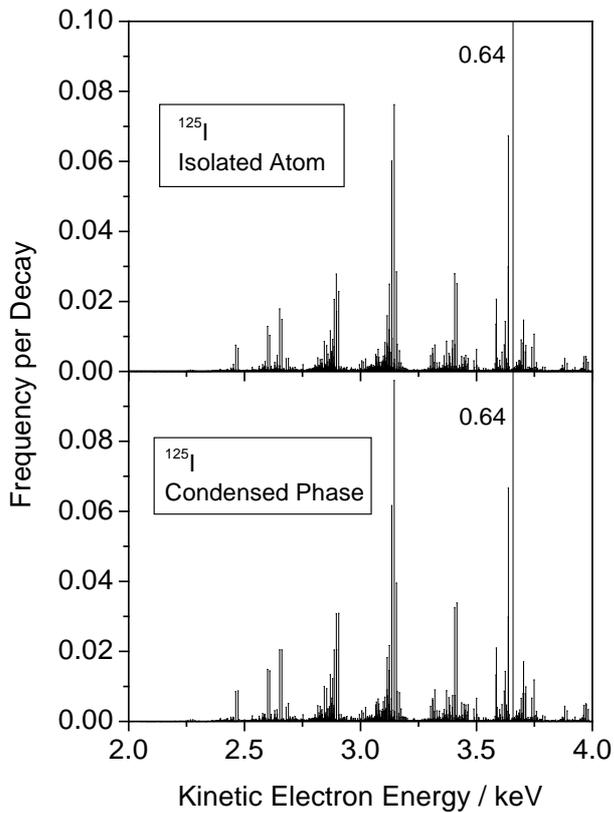
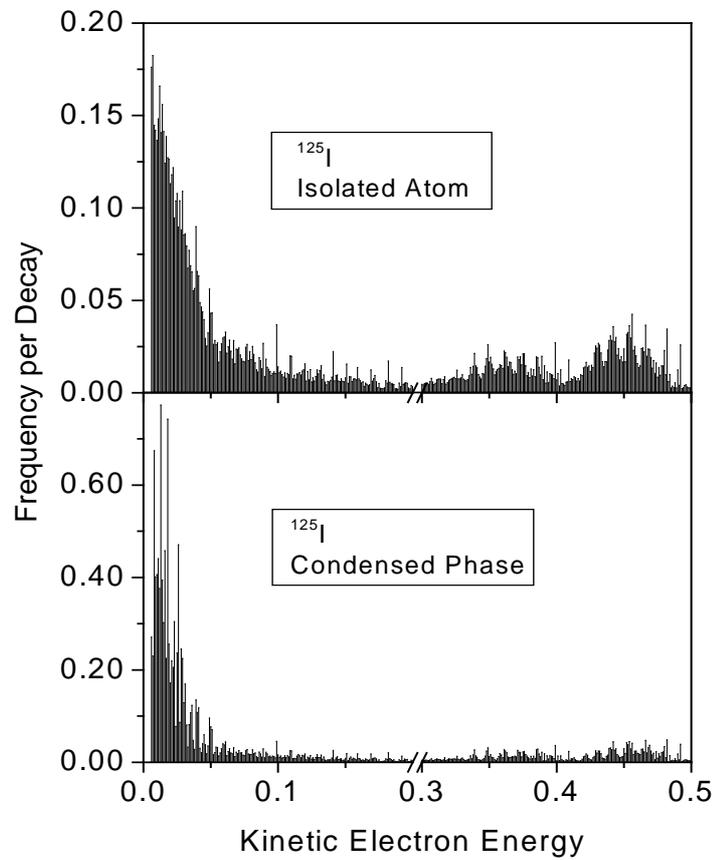


Abbildung 36: Elektronenspektrum für ^{125}I -Zerfälle (berechnet mit MC-Simulation)

fer nicht erlaubt ist.

Eine Neutralisation von Fehlstellen in den Valenzniveaus während der Auger-Kaskade erfordert einen physikalisch nur schwer zu verstehenden schnellen Ladungstransfer innerhalb von weniger als 10^{-14} s. Um den Einfluß einer schnellen Neutralisation auf die Zahl der emittierten Elektronen zu verdeutlichen, wurden hier beide Ansätze betrachtet, wobei eine Differenz von 6 Elektronen pro Zerfall auftrat (15 bzw. 21 im Falle eines isolierten Atoms bzw. der kondensierten Phase). Häufigkeitswerte und mittlere Energien für individuelle

Übergänge und Konversionselektronen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Die simulierten Elektronenspektren sind in Abbildung 36 für drei verschiedene Energiebereiche mit einer Bin-Breite von 1 eV dargestellt. Während es für die kinetischen Energien oberhalb von 2 keV nur kleine Unterschiede zwischen den Bedingungen des isolierten Atoms und denen der kondensierten Phase gibt, bestehen große Diskrepanzen bei Energien unterhalb von 50 eV (Abb. 36 oben, unterschiedliche Skalierung der Ordinaten!). Dies ist der Bereich der Coster-Kronig-NNX- und Auger-

Tabelle 8: Häufigkeiten und Energien der Konversions (CE)-, Auger (AUG)- und Coster-Kronig (CK)-Elektronen pro ^{125}I -Zerfall für die Fälle 'Isoliertes Atom' und 'Kondensierte Phase'

Übergang	Häufigkeit (Isol. Atom)	Häufigkeit (Kond. Phase)	Mittlere Energie (keV) (Isol. Atom)	Mittlere Energie (keV) (Kond. Phase)
CE-K	8.03E-01	8.03E-01	3.64E+00	3.64E+00
CE-L1	9.47E-02	9.69E-02	3.05E+01	3.05E+01
CE-L2	7.22E-03	7.61E-03	3.09E+01	3.09E+01
CE-L3	2.02E-03	1.93E-03	3.11E+01	3.11E+01
CE-M1	1.71E-02	1.65E-02	3.45E+01	3.45E+01
CE-M2	3.34E-03	3.21E-03	3.46E+01	3.46E+01
CE-M3	8.80E-04	8.80E-04	3.47E+01	3.47E+01
CE-N1	3.91E-03	3.90E-03	3.53E+01	3.53E+01
CE-N2	1.13E-03	8.10E-04	3.53E+01	3.53E+01
AUG - KLL	1.32E-01	1.33E-01	2.25E+01	2.25E+01
AUG - KLX	5.78E-02	5.80E-02	2.64E+01	2.64E+01
AUG - KXY	5.15E-03	5.48E-03	3.02E+01	3.02E+01
CK - LLX	2.64E-01	2.67E-01	2.81E-01	2.85E-01
AUG - LMM	1.24E+00	1.25E+00	3.03E+00	3.04E+00
AUG - LMX	3.46E-01	3.44E-01	3.66E+00	3.67E+00
AUG - LXY	2.24E-02	2.21E-02	4.30E+00	4.29E+00
CK - MMX	1.48E+00	1.49E+00	9.14E-02	9.42E-02
AUG - MXY	3.30E+00	3.31E+00	4.00E-01	4.05E-01
CK - NNX	3.21E+00	3.33E+00	2.93E-02	3.16E-02
AUG - NXY	2.15E+00	8.12E+00	2.07E-02	1.61E-02

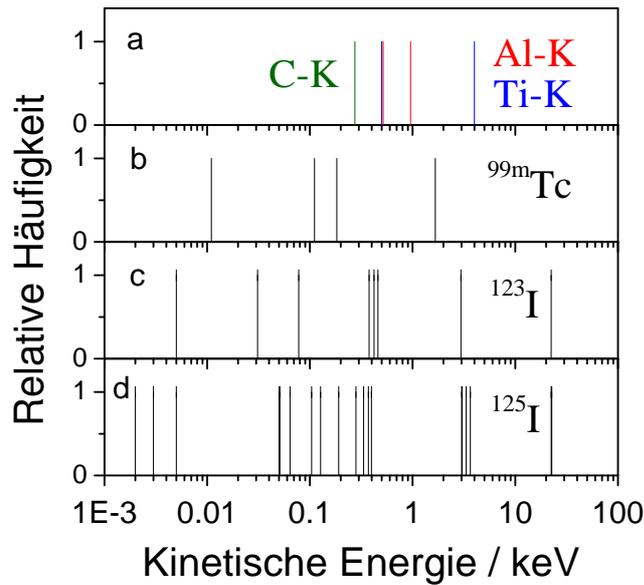


Abbildung 37: Elektronenspektren (a) nach ultra-weicher Röntgenstrahlung (jeweils einzelne Photonen) sowie nach individuellen Zerfällen je eines (b) ^{99m}Tc -, (c) ^{123}I - und (d) ^{125}I -Nuklides

NXY-Übergänge (s. Tab. 8), die stark abhängig sind von der Besetzung der Valenzschalen; diese wiederum hängt von der Möglichkeit ab, entvölkerte Schalen umgehend durch einen schnellen Ladungstransfer wiederaufzufüllen.

Vergleich der Spektren

Die Nuklide ^{125}I , ^{123}I und ^{99m}Tc zeigen entsprechend ihrer Größe und Zerfallscharakteristik unterschiedlich breite Häufigkeitsverteilungen für die Anzahl emittierter Elektronen mit Mittelwerten von 15 (^{125}I), 8,5 (^{123}I) und 4 (^{99m}Tc) Elektronen pro Zerfall. Typische Spektren für jeweils einen individuellen Zerfall (s. Abb. 37) lassen deutlich die verschiedenen Elektronen-Gruppen im Bereich unterhalb von 30 keV erkennen, die charakteristischen Auger-Übergängen zugeordnet werden können. Im vergleichbaren Energiebereich liegen die aus ultra-weicher Röntgenstrahlung resultierenden Sekundärelektronen. Auf diese Strahlenart wird im Zusammenhang mit dem Wichtungsfaktor näher eingegangen (s. Kap. 5).

Ein Vergleich der Energiespektren zwischen ^{123}I und ^{125}I (s. Tabn. 7 und 8 zeigt erwartungsgemäß, daß die Auger- und Coster-Kronig-Elektronen identische Energiewerte bei kleineren Häufigkeiten für ^{123}I besitzen. Die qualitati-

ven Unterschiede zwischen diesen beiden Spektren resultieren aus den Konversionselektronen, die bei ^{123}I im Bereich oberhalb von 100 keV liegen mit Häufigkeiten vergleichbar den meisten Auger-Elektronen. Im Gegensatz dazu repräsentiert das K-Konversionselektron die herausragendste Linie im ^{125}I -Spektrum mit einer Häufigkeit von 83 %.

4.3.2 Bahnspur-Rechnungen / Simulation von DNA-Schäden

Mit den Elektronen-Spektren aus jeweils 10000 individuellen Zerfällen der Nuklide ^{125}I , ^{123}I , ^{99m}Tc wurden in Zusammenarbeit mit der Universität Paul Sabatier Toulouse Bahnspur-Rechnungen durchgeführt. Aus Überlagerungen dieser Bahnspuren mit Helix- bzw. Nukleosomenmodellen (s. Abb. 25) konnten DNA-Strangbrüche mit unterschiedlicher Komplexität modelliert und ihre Häufigkeitsverteilung berechnet werden. Diese Strangbruchmuster erlauben wiederum Rückschlüsse auf die relative Effizienz der einzelnen Nuklide. Zum Vergleich wurde auch die Effizienz ultra-weicher Röntgenstrahlung simuliert, deren primäre Wechselwirkung mit biologischem Gewebe via Photoeffekt zur Erzeugung von einem Photoelektron und – je nach Photonenenergie – einem Auger-Elektron führt. Da es sich hier um Rechnun-

gen mit einem gegenüber den realen Verhältnissen vergleichsweise einfachen Modell handelt, können die absoluten Werte für die verschiedenen Nuklide nur grobe Anhaltswerte darstellen.

Die Häufigkeitsverteilung unterschiedlich komplexer Strangbruchmuster in Abhängigkeit von der deponierten Energie (s. Abb.38 spiegelt die relative Effektivität der drei verschiedenen Röntgenstrahlenergien in derselben Reihenfolge wider, wie sie aus vielen experimentellen Untersuchungen seit langem bekannt ist (s. Abb. 41). Das gleichförmig verteilte ^{125}I erweist sich hier zwar von etwas geringerer Wirksamkeit als die ultra-weiche Röntgenstrahlung, aber durchaus von gleicher Größenordnung. Deutlich stärker bei der Induktion komplexer Schäden (DSB+/DSB++) ist erwartungsgemäß das DNA-inkorporierte ^{125}I , das gegenüber gleichverteiltem ^{125}I eine um den Faktor 8,2 höhere Effektivität pro Zerfall zeigt.

Die Verteilung von Strangbrüchen, die durch einzelne Zerfälle bzw. durch einzelne Photonen hervorgerufen werden (s. Abb. 39) zeigt deutlich die geringe Wahrscheinlichkeit, mit einem einzelnen Photon die DNA zu treffen. Auch gleichverteiltes ^{125}I ist bei dieser Art der Normierung aufgrund der relativ vielen pro Zerfall emittierten Auger-Elektronen natürlich wesentlich effizienter als die ein bis zwei infolge des Photoeffektes freigesetzten Elektronen der ultra-weichen Röntgenstrahlung. Bemerkenswert ist trotzdem der relativ hohe Prozentsatz (>80 %) von ^{125}I -Zerfällen, die in

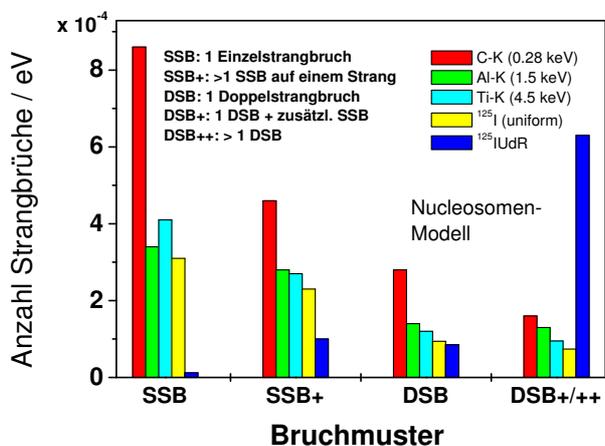


Abbildung 38: DNA-Strangbruchmuster nach Zerfall von ^{125}I bzw. nach ultra-weicher Röntgenstrahlung

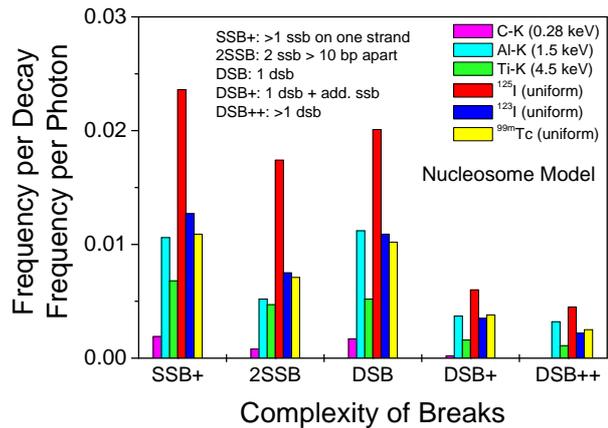


Abbildung 39: DNA-Strangbruchmuster nach Zerfall von gleichverteiltem ^{125}I , ^{123}I und ^{99m}Tc bzw. nach ultra-weicher Röntgenstrahlung

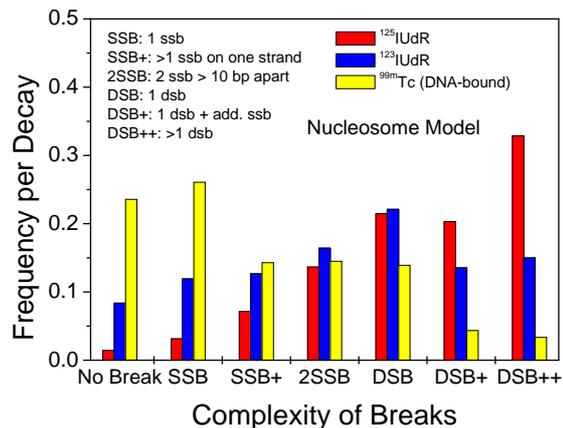


Abbildung 40: DNA-Strangbruchmuster nach Zerfall von DNA-gebundenem ^{125}I , ^{123}I und ^{99m}Tc

Hinblick auf eine Strangbruch-Induktion wirkungslos bleiben. Bei den vergleichsweise selten auftretenden schweren DSB-Schäden zeigt sich ^{125}I hier allerdings gegenüber ^{123}I und ^{99m}Tc als deutlich wirkungsvoller, bei den DSB++-Schäden etwa doppelt so effizient wie die beiden anderen Nuklide, deren Verteilungsspektren einander sehr ähnlich sind.

Bei Zerfällen innerhalb der DNA dagegen demonstriert ^{125}I sein großes Schadenspotential (s. Abb. 40). Kaum ein Zerfall bleibt wirkungslos, in mehr als 30 % der Zerfälle werden sogar zwei DSB induziert. Von speziellem Interesse für das Verständnis der Wirkungsmechanismen ist ein Vergleich zwischen den beiden Isotopen ^{123}I und ^{125}I . Zum einen kann bei ei-

Tabelle 9: Häufigkeitsverteilungen von Strangbruchmustern nach Zerfall von $^{123}\text{IUdR}$ und $^{125}\text{IUdR}$ (SSB: ein Einzelstrangbruch; SSB+: zwei oder mehrere Einzelstrangbrüche auf demselben Strang; 2SSB: zwei Einzelstrangbrüche auf gegenüberliegenden Strängen im Abstand von mehr als 10 Basenpaaren; DSB: ein Doppelstrangbruch; DSB+: ein DSB plus ein zusätzlicher SSB; DSB++: zwei oder mehr DSB)

Art des Bruches	$^{123}\text{IUdR}$	$^{125}\text{IUdR}$	$^{125}\text{IUdR}/^{123}\text{IUdR}$
kein Bruch	0,084	0,014	0,2
SSB	0,119	0,031	0,3
SSB+	0,127	0,071	0,6
2SSB	0,164	0,137	0,8
DSB	0,221	0,215	1,0
DSB+	0,135	0,203	1,5
DSB++	0,150	0,329	2,2

nem deutlichen Effizienz-Unterschied die chemische Transformation zu Tellur als wesentliche Ursache für den starken Effekt ausgeschlossen werden, zum anderen sollte sich bei alleiniger Elektronen-Ursache eine etwa zweifach größere Effizienz von ^{125}I gegenüber ^{123}I ergeben, da ^{125}I etwa doppelt so viele Elektronen pro Zerfall emittiert (s. Kap. 4.3.1.2). *In vitro*-Experimente mit diesen beiden Nukliden [Mak89] haben gezeigt, daß ^{125}I beim Endpunkt Zellüberleben pro Zerfall um einen Faktor 2,3 effizienter ist als ^{123}I . Ein nahezu gleicher Effizienzunterschied (2,2) ergibt sich aus den hier simulierten Strangbrüchen (s. Tab. 9), wenn man nur die besonders komplexen DSB++-Schäden berücksichtigt. Doppelstrangbrüche mögen nicht die alleinige Ursache für strahleninduzierten Zelltod sein, aber die Übereinstimmung des hier gefundenen Effizienzunterschiedes mit dem experimentellen Wert könnte ein Hinweis darauf sein, daß komplexe Strangbrüche eine spezifische Rolle bei der Induktion lethaler Schäden spielen.

Läßt man auch ^{99m}Tc innerhalb der DNA zerfallen, so erweist sich dieses Nuklid auch gegenüber ^{123}I als deutlich schwächer (s. Abb. 40).

5 Strahlenwichtungsfaktoren

Aufgrund der geringen Elektronen-Energien und der damit einhergehenden extrem kurzen Reichweite in biologischem Gewebe (zwischen etwa 1 nm und 10 μm) verursachen Auger-Elektronen-Emitter räumlich stark begrenzte Effekte. Diese hängen somit in starkem Maße von der zellulären und subzellulären Verteilung der Radionuklide bzw. von ihrer Nähe zu biologisch sensitiven Targets ab. Hoch-LET-ähnliche Effekte ergeben sich beispielsweise bei Zerfall innerhalb der DNA, während Zerfälle außerhalb des Zellkerns eine Niedrig-LET-Komponente aufweisen. ICRP-92 [ICR03] empfiehlt einen Strahlenwichtungsfaktor von 20 und größer für den Fall DNA-gebundener Auger-Emitter, für Auger-Emitter außerhalb der DNA wird auf RBE-Werte zwischen 1,5 und 8 verwiesen entsprechend verschiedener Endpunkte in Zellstudien. Somit sollte ein Strahlenwichtungsfaktor in jedem Fall oberhalb des üblichen Wertes von 1 für Elektronen liegen.

Konventionelle Organ-Dosimetrie nach MIRD [Loe91] unterstellt eine gleichförmige Energie-deposition im interessierenden Volumen. Diese Bedingung wird von Auger-Elektronen-Emittern sicher nicht ohne weiteres erfüllt. Insbesondere stellt sich bei stark inhomogenen Energiedepositionen wie beispielsweise bei DNA-Inkorporationen der Nuklide die Frage nach dem geeigneten Targetvolumen (Zellhaufen, Zelle, Zellkern, Chromatin, DNA-Helix), um einen sinnvollen Dosiswert berechnen zu können.

5.1 Kombinierte Wichtungsfaktoren

Wegen dieser grundsätzlichen Problematik soll daher hier ein neuer Ansatz versucht werden, um einen geeigneten Vergleich zwischen Auger-Emittern und Niedrig-LET-Strahlung zu ermöglichen, der eine quantitative Aussage über die biologische Wirksamkeit von Auger-Emittern erlaubt. Ausgangspunkt dieses Ansatzes sind nicht-DNA-gebundene Auger-Elektronen-Emitter, bei denen näherungsweise von einer räumlichen Gleichverteilung innerhalb der Zellen ausgegangen werden kann. Eine solche Situation ist z.B. vergleichbar

mit der Exposition durch ultra-weiche Röntgenstrahlung. Diese wechselwirkt fast ausschließlich über Photoeffekt mit dem biologischen Gewebe, wobei das emittierte niederenergetische Photoelektron (und eventuell ein weiteres Auger-Elektron) genauso wie die Auger-Elektronen aus zerfallenden Radionukliden vollständig lokal absorbiert werden. Für gleichverteilte Auger-Elektronen-Emitter lassen sich also in gleicher Weise wie für ultra-weiche Röntgenstrahlung makroskopische Dosisseinheiten angeben. Dadurch wird ein direkter Vergleich mit anderen konventionellen Strahlenarten möglich und somit auch die Abschätzung eines RBW-Wertes. Da die Dosis durch die Anzahl der Zerfälle bestimmt wird, lassen sich diese natürlich auch in Relation setzen zu den Zerfallszahlen DNA-inkorporierter Auger-Emitter:

$$N_{\text{gleichverteilt}}/N_{\text{DNA-gebunden}}$$

Man kann somit einen kombinierten Wert für die biologische Wirksamkeit DNA-gebundener Auger-Emitter errechnen, indem man diesen Quotienten mit einem dosis-basierten RBW-Wert

$$D_{\text{Niedrig-LET}}/D_{125\text{I}_{\text{gleichverteilt}}}$$

für gleichverteilte Auger-Emitter multipliziert.

5.2 ^{125}I

Dieses Verfahren soll im folgenden am Beispiel von ^{125}I näher betrachtet werden: zum einen an den experimentellen Ergebnissen dieser Studie zu den Endpunkten “Klonogenes Überleben” und “DNA-Schädigungen”, zum anderen an experimentellen Literaturdaten.

5.2.1 Klonogenes Überleben

Die hier mit dem Koloniebildungstest gefundenen D_{37} -Werte für T1- sowie für 86HG-39-Zellen sind in den Tabellen 10 und 11 zusammengefaßt. Dabei sind entsprechend Kapitel 5.1 die Werte für $^{125}\text{IUdR}$ in Einheiten von “Anzahl der Zerfälle pro Zelle”, die für $^{137}\text{Cs-}\gamma$ -Strahlung in Einheiten der Energiedosis (“Gray”) und die für $^{125}\text{I-AP}$ in beiden Einheiten wiedergegeben. Dabei wurde die Dosis

Tabelle 10: Vergleich der biologischen Wirksamkeit von $^{125}\text{IUdR}$, $^{125}\text{I-AP}$ und $^{137}\text{Cs-}\gamma$ am Beispiel des klonogenen Überlebens von T1-Zellen

T1-Zellen	Nuklid/ Träger- molekül	D_{37}	Wirkungs- faktor
Zerfälle/ Zelle	$^{125}\text{IUdR}$	90	12,9
	$^{125}\text{I-AP}$	1160	
Dosis [Gy]	$^{125}\text{I-AP}$	0,86	1,9
	$^{137}\text{Cs-}\gamma$	1,61	
Verhältnis $^{125}\text{IUdR}$ zu $^{137}\text{Cs-}\gamma$			24,5

Tabelle 11: Vergleich der biologischen Wirksamkeit $^{125}\text{IUdR}$, $^{125}\text{I-AP}$ und $^{137}\text{Cs-}\gamma$ am Beispiel des klonogenen Überlebens von 86HG-39-Zellen

86HG-39- Zellen	Nuklid/ Träger- molekül	D_{37}	Wirkungs- faktor
Zerfälle/ Zelle	$^{125}\text{IUdR}$	80	14,1
	$^{125}\text{I-AP}$	1130	
Dosis [Gy]	$^{125}\text{I-AP}$	1,37	2,0
	$^{137}\text{Cs-}\gamma$	2,68	
Verhältnis $^{125}\text{IUdR}$ zu $^{137}\text{Cs-}\gamma$			28,2

pro $^{125}\text{I-AP}$ -Zerfall aus der mittleren deponierten Energie (14,1 bzw. 13,4 keV) pro Zellmasse in T1-Zellen (Radius = $9\ \mu\text{m}$; $M = 30,5 \cdot 10^{-13}$ kg) zu 0,74 mGy bzw. in 86HG-39-Zellen (Radius = $7,5\ \mu\text{m}$; $M = 17,7 \cdot 10^{-13}$ kg) zu 1,2 mGy errechnet. Durch Multiplikation der Teilfaktoren aus dem Vergleich $^{125}\text{IUdR}$ zu $^{125}\text{I-AP}$ sowie $^{125}\text{I-AP}$ zu $^{137}\text{Cs-}\gamma$ -Strahlung ergibt sich der Wirkungsfaktor von $^{125}\text{IUdR}$, bezogen auf $^{137}\text{Cs-}\gamma$ -Strahlung.

Für T1-Zellen ergibt sich somit für $^{125}\text{IUdR}$ ein kombinierter Wichtungsfaktor von 24,5 gegenüber $^{137}\text{Cs-}\gamma$ -Referenzstrahlung (s. Tab. 10), resultierend aus dem Produkt 12,9 ($^{125}\text{I-AP}_{D37}/^{125}\text{IUdR}_{D37}$) und 1,9 ($^{137}\text{Cs}_{D37}/^{125}\text{I-AP}_{D37}$).

$^{125}\text{I-AP}_{D37}$). Für 86HG-39-Zellen gilt mit 28,2 ein etwas höherer Wert (s. Tab. 11).

Experimentelle Literaturdaten

Ein weiterer Wirkungsfaktor für $^{125}\text{IUdR}$ zum Endpunkt "Klonogenes Überleben" läßt sich aus Literaturdaten ableiten. Als Ausgangspunkt dienen hier Experimente zum Zellüberleben nach 250-kV-Röntgenstrahlung wie nach $^{125}\text{IUdR}$ und $^{125}\text{I-DR}$ (Iododihydrorhodamin) (s. Abb. 41). Zum Vergleich sind hier auch Überlebenskurven für die gleiche Zelllinie (V79-Hamsterzellen) nach ultra-weicher Röntgenstrahlung [Goo79] wiedergegeben, die sich hier als deutlich effektiver erweist als gleichförmig verteiltes ^{125}I . Es konnte nur eine ^{125}I -Arbeit [Kas87] ausgewertet werden, in der sowohl die gleiche Zelllinie wie bei der Röntgenstrahlung als auch nicht-DNA-gebundenes ^{125}I , in diesem Fall in Form von $^{125}\text{I-DR}$ eingesetzt worden war. Aufgrund der starken Akkumulation des $^{125}\text{I-DR}$ im Cytoplasma wurden die Daten so korrigiert, daß von einer Gleichverteilung ausgegangen werden kann. Für die 250-kV-Röntgenstrahlung gibt [Kas87] lediglich einen einzigen Wert (D_{37}) an. Vergleicht man diesen mit dem D_{37} -Wert für gleichverteiltes ^{125}I , so ergibt sich eine um den Faktor 1,3 höhere Effektivität von ^{125}I . Läßt man dagegen den entsprechenden 250-kV-Wert aus [Goo79] (s. Abb 41) zu, so wird das Verhältnis

$$D_{250\text{-kV-Röntgen}}/D_{^{125}\text{I}_{\text{gleichverteilt}}}$$

sogar kleiner als 1.

Ein Vergleich zwischen $^{125}\text{IUdR}$ und gleichförmig verteiltem ^{125}I für das 37 %-Überlebensniveau auf der Basis von Zerfallszahlen (s. Abb. 42) ergibt ein Verhältnis von

$$N_{^{125}\text{I}_{\text{gleichverteilt}}}/N_{^{125}\text{IUdR}} = 5.$$

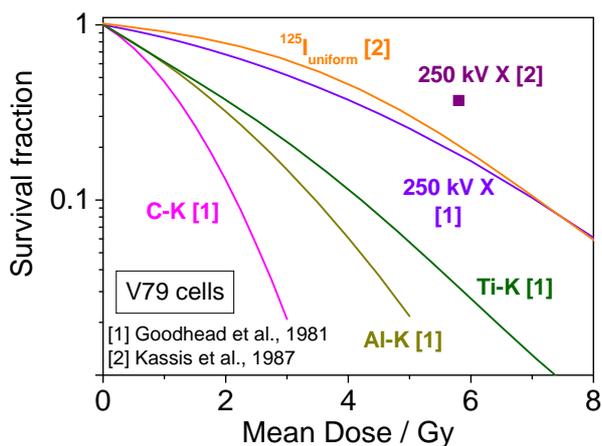


Abbildung 41: Zellüberleben nach gleichförmig verteiletem ^{125}I , 250 kV-Röntgenstrahlung [Kas87] sowie nach ultra-weicher Röntgenstrahlung [Goo79]

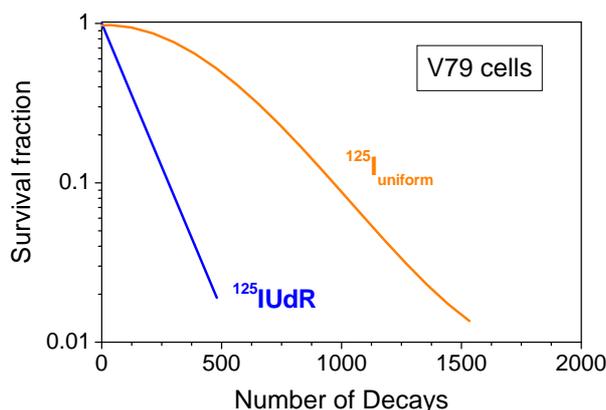


Abbildung 42: Zellüberleben nach gleichförmig verteiletem ^{125}I sowie nach $^{125}\text{IUdR}$ (Daten aus [Kas87])

Berücksichtigt man die 1,3-fach höhere Effizienz von gleichverteiletem ^{125}I gegenüber 250 kV-Röntgenstrahlung (s.o), so läßt sich hier eine kombinierte Effektivität von 6,5 für $^{125}\text{IUdR}$ im Vergleich zu Niedrig-LET-Strahlung ableiten.

5.2.2 DNA-Schädigungen

Hinsichtlich der mit dem COMET-Assay gemessenen molekularen Schäden wird hier als Bezugspunkt willkürlich ein OTM von 3,0 angenommen. Damit ergibt sich ein Wirkungsfaktor von 1,8 für $^{125}\text{IUdR}$, bezogen auf $^{137}\text{Cs-}\gamma$ -Strahlung, ein relativ kleiner Wert (s. Tab. 12), resultierend aus den geringen Unterschieden

Tabelle 12: Vergleich der biologischen Wirksamkeit $^{125}\text{IUdR}$, $^{125}\text{I-AP}$ und $^{137}\text{Cs-}\gamma$ am Beispiel der DNA-Schädigung von 86HG-39-Zellen

86HG-39-Zellen	Nuklid/Trägermolekül	OTM 3,0	Wirkungsfaktor
Zerfälle/Zelle	$^{125}\text{IUdR}$	1450	1,2
	$^{125}\text{I-AP}$	1750	
Dosis [Gy]	$^{125}\text{I-AP}$	1,3	1,5
	$^{137}\text{Cs-}\gamma$	1,9	
Verhältnis $^{125}\text{IUdR}$ zu $^{137}\text{Cs-}\gamma$			1,8

von $^{125}\text{I-AP}$ zu $^{125}\text{IUdR}$ (1,2) und $^{137}\text{Cs-}\gamma$ zu $^{125}\text{I-AP}$ (1,5). Der Grund hierfür liegt in unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Während das Zellüberleben bei 37°C gemessen wurde, erfolgte der COMET-Assay bei 0°C , um die nach $^{125}\text{I-AP}$ und γ -Exposition vorwiegend entstehenden DNA-Einzelstrangbrüche nicht durch Reparatur unmessbar zu machen (Doppelstrangbrüche werden auch bei 37°C fast kaum repariert), so daß die Relation von Doppel- zu Einzelstrangbrüchen sich stark verringerte.

Die Häufung von Strangbrüchen in Form von Clustern, die die einzelnen Brüche nicht mehr einzeln erkennen lassen, führt zur Unterschätzung der Bruchzahl. Yasui et al. [Yas00] fanden z.B. für Doppelstrangbrüche durch $^{125}\text{IUdR}$ einen vergleichsweise niedrigen RBW-Wert von 2,9 bei einer CHO-Zell-Linie und führten dieses Ergebnis auf gehäufte Läsionen in Form von Clustern zurück, die durch den inhomogenen Einbau des $^{125}\text{IUdR}$ in die DNA verursacht würden.

5.3 ^{123}I

Für dieses Nuklid kann hier zunächst nur auf modell-theoretische Ergebnisse zurückgegriffen werden. Diese zeigen, daß die Wirkung von DNA-inkorporiertem ^{123}I gegenüber ^{125}I bei der Induktion komplexer Doppelstrangbrüche um etwa 50 % reduziert ist. Dieser Wert spiegelt experimentelle Literaturdaten zum klonogenen Überleben gut wider. Durchaus plausibel erscheint dieses Ergebnis auch unter dem

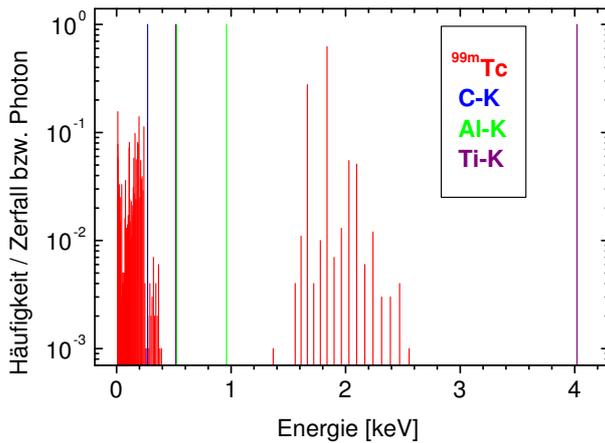


Abbildung 43: Sekundärelektronen-Spektrum für ultra-weiche Röntgenstrahlung und der niederenergetische Bereich des ^{99m}Tc -Spektrums

Aspekt, daß wegen der Charakteristika der beiden Zerfallsprozesse ^{123}I im Mittel nur halb so viele Auger-Elektronen pro Zerfall emittiert wie ^{125}I .

5.4 ^{99m}Tc

Als Beispiel für eine rein dosis-basierte Abschätzung der biologischen Wirksamkeit soll hier der Fall von gleichverteiltem ^{99m}Tc betrachtet werden. Die Gesamtdosis läßt sich in unterschiedliche Fraktionen aufspalten entsprechend der beteiligten Strahlenanteile, denen entsprechende RBE-Werte zugeordnet werden können (s. Tab. 13). Während für Photonen und höherenergetische Elektronen ein RBE-Wert von 1 angenommen werden kann, lassen sich die Konversionselektronen mit weniger als 3 keV und die Auger-Elektronen mit dem Sekundärelektronen-Spektrum aus der ultra-weichen Röntgenstrahlung vergleichen. Beide liegen im selben Energiebereich (s. Abb. 43).

Auch Bahnspur-Berechnungen ergeben für die Energiedepositionen in subzellulären Volumina bei Gleichverteilung der Nuklide keine allzu großen Unterschiede zwischen der ultra-weichen Röntgenstrahlung und ^{99m}Tc -Nukliden (s. Tab. 14).

^{99m}Tc verursacht darüber hinaus ein nahezu identisches Spektrum primärer DNA-Strangbrüche wie Kohlenstoff-K-Strahlung (s. Abb. 44). Dieser Strahlung, und somit auch

Tabelle 13: RBE-Werte und Dosisfraktionen (Testicular-Dosis) verschiedener Komponenten des Emissionsspektrums nach [Nar94]; CE: Konversionselektronen; AE: Auger-Elektronen)

	Photonen	CE ≥ 100 keV	CE ≤ 3 keV und AE
RBE	1	1	4
Dosisfraktion	0,06	0,89	0,05

Tabelle 14: Deponierte Energie (eV) pro Photon bzw. Zerfall in verschiedenen Volumina (nach Bahnspur-Rechnungen)

Target	C-K	Al-K	Ti-K	^{99m}Tc
Testvolumen (\varnothing 25 nm)	137	258	187	201
Bulk Water	126	238	171	188
DNA	11	20	15	13

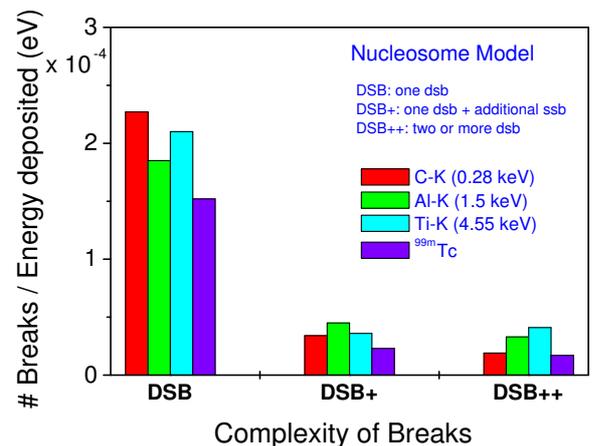


Abbildung 44: DNA-Strangbruchmuster nach Zerfall von ^{99m}Tc bzw. nach ultra-weicher Röntgenstrahlung

den Auger-Elektronen des ^{99m}Tc ist mit einem RBW-Wert von 4 hinreichend Rechnung getragen (s. Tab. 15).

Wichtet man die einzelnen Dosisfraktionen f_n

Tabelle 15: RBW-Werte für Kohlenstoff-K-Strahlung

Zelllinie	Endpunkt	RBW	Referenz
V79	Inaktivierung	3,4	[Raj87]
V79	Inaktivierung	3,3	[Goo81]
HF19	Inaktivierung	3,8	[Goo81]
C3H10T1/2	Inaktivierung	1,3	[Sch89]
C3H10T1/2	Inaktivierung	2-4,1	[Fra95]
C3H10T1/2	Oncogenic Transformation	2 - 4	[Fra95]
Mutant Cells (rad54-3)	Inaktivierung	2,6	[Fra86]
Hefezellen	Doppelstrangbruch	3,8	[Fra86]

gleichförmig innerhalb der Zelle verteilte Auger-Elektronen emittierende Nuklide offensichtlich ein gegenüber Niedrig-LET-Strahlung erhöhter RBW-Wert im Bereich zwischen 1 und 2 das Strahlenrisiko hinreichend berücksichtigt.

Tabelle 16: Experimentell bestimmte RBW-Werte für ^{99m}Tc (Endpunkt: Spermhead Survival, Swiss Webster Mice)

Chemische Form	RBE	Referenz
^{99m}Tc -HDP	1,4	[Rao88]
^{99m}Tc -HDP	1,14	[Nar94]
^{99m}Tc -PYP	0,8	[Nar94]
^{99m}Tc -O ₄	0,96	[Nar94]

in Gleichung 7 mit individuellen RBW-Werten (s. Tab. 13), so ergibt sich ein theoretischer Gesamt-RBW von 1,15. Dieser Wert korrespondiert sehr gut mit experimentell bestimmten RBW-Werten aus der Literatur (s. Tab. 16).

$$\begin{aligned}
 & \text{RBW}_{\text{theor.}}(^{99m}\text{Tc}) \\
 &= f_{\text{Phot.}} \cdot \text{RBW}_{\text{Phot.}} + f_{\text{CE}} \cdot \text{RBW}_{\text{CE}} \\
 & \quad + f_{\text{AE}} \cdot \text{RBW}_{\text{AE}} \quad (7) \\
 &= 0,06 \cdot 1 + 0,89 \cdot 1 + 0,05 \cdot 4,0 = 1,15
 \end{aligned}$$

Aus diesem Beispiel wie auch aus den Werten für ^{125}I -AP zeigt sich, daß für

6 Zusammenfassung

Für Auger-Elektronen emittierende Radionuklide gibt es gegenwärtig keine verbindlichen Strahlenwichtungsfaktoren. Die Bestimmung solcher Faktoren bereitet für diese Nuklide ein besonderes Problem, da die Energiedeposition der sehr niederenergetischen Auger-Elektronen (von wenigen eV bis zu einigen zehn keV) in biologischem Gewebe ein extrem lokales Ereignis ist, das sich mit makroskopischen Dosisseinheiten nicht hinreichend charakterisieren läßt.

Im experimentellen Teil wurde der Auger-Emitter ^{125}I an drei verschiedenen Loci innerhalb der beiden menschlichen Nieren-T1- und Glioblastom-86HG-39-Zellen positioniert: als $^{125}\text{IUdR}$ in der DNA, als ^{125}I -Antipyrin (AP) gleichmäßig in der gesamten Zelle und als Na^{125}I außerhalb der Zelle. Hinsichtlich Zellüberlebens wurde eine etwa doppelt so große Effektivität von ^{125}I -AP gegenüber ^{137}Cs - γ -Strahlung gefunden. Auf der Basis von Zerfallszahlen wiederum zeigte sich $^{125}\text{IUdR}$ um einen Faktor 13 (T1-Zellen) bzw. 14 (86HG-39-Zellen) effizienter als ^{125}I -AP, so daß sich ein kombinierter Wirkungsfaktor von etwa 26 - 28 für DNA-inkorporiertes ^{125}I gegenüber Niedrig-LET-Strahlung ergab.

Im modell-theoretischen Teil wurden für die Nuklide ^{125}I , ^{123}I , und ^{99m}Tc Elektronenspektren berechnet. Mittels Bahnspur-Simulationen und deren Überlagerung mit Nukleosomen-Modellen konnten DNA-Strangbruchmuster ermittelt werden. Sowohl bei gleichverteilten wie bei DNA-gebundenen Nukliden zeigte sich ^{125}I deutlich effizienter als ^{123}I , und dieses wiederum effizienter als ^{99m}Tc . Bei Mehrfach-Doppelstrangbrüchen ergab sich eine um den Faktor 2,3 höhere Effektivität von $^{125}\text{IUdR}$ gegenüber $^{123}\text{IUdR}$. Auf der Basis von Literaturdaten wurde für V79-Hamsterzellen ein RBW-Wert von 1,3 für in der Zelle gleichverteiltes ^{125}I -AP sowie ein kombinierter Wirkungsfaktor von 6,5 für $^{125}\text{IUdR}$ ermittelt. Eine Abschätzung für gleichverteiltes ^{99m}Tc ergab einen RBW-Wert von 1,2.

Summary

There are currently no generally binding radiation weighting factors for Auger electron emitting radionuclides. The determination of these factors is a particular problem because the energy deposition by the very low-energy Auger electrons (a few eV up to some tens of keV) in biological tissue is an extremely local event which cannot be adequately characterised by macrodosimetric dose quantities.

In the experimental part, the Auger emitter ^{125}I was positioned at three different loci inside the human kidney T1 and glioblastoma 86HG-39 cells: in the form of $^{125}\text{IUdR}$ in the DNA, as ^{125}I -antipyrin (AP) uniformly within the cell, and as Na^{125}I outside the cell. With regard to cell survival, ^{125}I -AP was found to be twice as efficient compared to ^{137}Cs - γ irradiation. In turn, on the basis of decay numbers, $^{125}\text{IUdR}$ was more efficient than ^{125}I -AP by a factor of 13 (T1 cells) and 14 (86HG-39 cells), so that a combined weighting factor of about 26 - 28 for DNA incorporated ^{125}I versus low LET irradiation was found.

In the modelling part, the electron emission spectra of the nuclides ^{125}I , ^{123}I , and ^{99m}Tc were calculated. DNA strand break patterns could be assessed from track structure simulations in combination with nucleosome models. With uniformly distributed nuclides as well as with DNA-bound nuclides, ^{125}I was found to be clearly more efficient than ^{123}I , and the latter proved more efficient than ^{99m}Tc . For multiple double strand breaks, an increased efficiency by a factor of 2.3 was found for $^{125}\text{IUdR}$ versus $^{123}\text{IUdR}$. From the literature, an RBE value of 1.3 for uniformly distributed ^{125}I and a combined weighting factor of 6.5 for $^{125}\text{IUdR}$ was determined for V79 hamster cells. An assessment for uniformly distributed ^{99m}Tc showed an RBE value of 1.2.

7 Literatur

Literatur

- [Ban79] Band IM et al., 1979, *At. Data Nucl. Data Tables* 23, 443
- [Blo81] Bloomer WD et al., 1981, *J. Radioanal. Chem.* 65, 209
- [Car63] Carlson TA and White RM, 1963, *J. Chem. Phys.* 38, 2930
- [Car66] Carlson TA and White RM, 1966, *J. Chem. Phys.* 44, 4510
- [Car66b] Carlson TA et al., 1966, *Phys. Rev.* 151, 41
- [Car73] Carlson TA and Nestor CW, 1973, *Phys. Rev. A* 8, 2887
- [Cha81] Charlton DE and Booz J, 1981, *Radiat. Res.* 87, 10
- [Che79] Chen MH et al., 1979, *At. Data Nucl. Data Tables* 24, 13
- [Cla74] Clauß G und Ebner H, 1974, *Grundlagen der Statistik*, Verlag Volk und Wissen, Berlin, 116ff.
- [Des75] Desclaux JP, 1975, *Comput. Phys. Commun.* 9, 31
- [Dik98] Dikomey E et al., 1998, *Int. J. Radiat. Biol.* 73, 269
- [Ell61] Ellman GL et al., 1961, *Biochem. Pharmacol.* 7, 88
- [Fei71] Feinendegen LE et al., 1971, Biological toxicity associated with the Auger effect. In: *Proc. Symp. on Biophysical Aspects of Radiation Quality*, Ebert (Ed.), Vienna: IAEA, 419
- [Fra86] Frankenberg D et al., 1986, *Int. J. Radiat. Biol.* 50, 727
- [Fra95] Frankenberg D et al., 1995, *Int. J. Radiat. Biol.* 68, 593
- [Goo79] Goodhead DT et al., 1979, *Int. J. Radiat. Biol.* 36, 101
- [Goo81] Goodhead DT et al., 1981, *Phys. Med. Biol.* 26, 1115
- [Hof71] Hofer KG and Hughes WL, 1971, *Radiat. Res.* 47, 94
- [How92] Howell RW, 1992, *Med. Phys.* 19, 1371
- [ICR83] ICRP, 1983, *Radionuclide Transformations*. Publication 38, International Commission on Radiological Protection, Pergamon Press, Oxford
- [ICR03] ICRP, 2003, *Relative Biological Effectiveness (RBE), Quality Factor (Q), and Radiation Weighting Factor (wr)*, ICRP Publication 92, Pergamon Press, Oxford
- [Kas80] Kassis AI and Adelstein SJ, 1980, *Radiat. Res.* 84, 407
- [Kas87] Kassis AI et al., 1987, *Radiat. Res.* 109, 78
- [Kra79] Krause MO, 1979, *J. Phys. Chem. Rev. Data* 8, 307
- [Lib83] Liber H et al., 1983, *Mutation Res.* 111, 387
- [Loe91] Loevinger et al., *MIRD Primer for Absorbed Dose Calculations*, Revised, Society of Nuclear Medicine, New York
- [Mak89] Makrigiorgos M et al., 1989, *Radiat. Res.* 118, 532
- [Mar81] Martin RF and Haseltine WA, 1981, *Science* 213, 896
- [McA94] McAteer JA and Davis JM, Basic cell culture technique and maintenance of cell lines, in: *Basic cell culture - A practical approach*. Davis J.M (Hrsg.), 120-140, Oxford University Press, Oxford (1994).
- [McG74] McGuire EJ, 1974, *Phys. Rev. A* 9, 1840
- [Muk86] Mukoyama T, 1986, *J. Phys. Soc. Jpn.* 55 3054
- [Muk87] Mukoyama T et al., 1987, *J. Phys. B: At. Mol. Phys.* 20, 4453
- [Nar94] Narra VR et al., 1994, *Med. Phys.* 21, 1921
- [Oli90] Olive PL et al., 1990, *Radiat. Res.* 122, 86
- [Ple57] Pleasonton F and Snell AH, 1957, *Proc. Roy. Soc. (London)* 241A, 141
- [Pom87] Pomplun E et al., 1987, *Radiat. Res.* 111, 533
- [Pom91] Pomplun E, 1991, *Int. J. Rad. Biol.* 59, 625
- [Pom94] Pomplun E and Terrissol M, 1994, *Radiat. Environ. Biophys.* 33, 279
- [Pom00] Pomplun E, 2000, *Acta Oncologica* 39, 673
- [Raj87] Raju MR et al., 1987, *Radiat. Res.* 110, 396
- [Rao88] Rao DV et al., 1988, Internal Auger emitters: Effects on spermatogenesis and oogenesis in mice. In: *DNA Damage by Auger Emitters*, Baverstock KF and Charlton DE (Eds.), Taylor & Francis, London, pp. 15-26

- [Sch89] Schillaci ME et al., 1989, Radiat. Res. 118, 83
- [Sco73] Scofield JH 1973, Theoretical photoionization cross sections from 1 to 1500 keV. Report UCRL-51326, U.S. Atomic Energy Commission
- [Sed98] Sedelnikova OA et al., 1998, J. Nucl. Med. 39, 1412
- [Sha99] Sharan RN et al., 1999, Effects of boron particle irradiation on cell survival and acetylcholin esterase activity in human and rat cell lines in vitro. Annual Report, 5.4.2, 114-116, National Science Center, Delhi, India
- [Sin88] Singh NP et al., 1988, Exp. Cell Res. 175, 184
- [Sto70] Storm E and Israel HI, 1970, Nucl. Data Tables A7, 565
- [Tal55] Talso PJ et al., 1955, J. Lab. Clin. Med. 46, 619
- [Taw92] Tawara H et al., 1992, J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys. 25, 1467
- [Tho58] Thompson AM et al., 1958, Am. J. Phys. 192, 531
- [Vri00] Vrigneaud JM, 2000, Développement d'un modèle biophysique pour l'évaluation des dommages radio-induits dans la fibre chromosomique, Dissertation Université Paul Sabatier Toulouse
- [Yas00] Yasui LS et al., 2000, Acta Oncologica 39, 739
- [Zer01] Zerhusen S, 2001, Beitrag zum Verständnis der biologischen Wirksamkeit des Auger-Elektronen emittierenden Radionuklids ^{125}I in menschlichen Zellen. In: "Berichte des Forschungszentrums Jülich (Jül-3882)", ISSN 0944-2952.