



Technische Universität München
Fakultät für Medizin

Untersuchung synergistischer Wirkungen ionisierender Strahlung und statischer Magnetfelder bei PET-MRT-Untersuchungen

Elisabeth Heidi Günther

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Matthias Eiber
2. Prof. Dr. Michael J. Atkinson

Die Dissertation wurde am 18.08.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.04.2021 angenommen.

1. Einleitung	4
1.1. Allgemeines	4
1.2. Das Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie und der Magnetresonanztomographie	6
1.3. PET-MRT- und PET-CT-Hybridgeräte	8
1.4. Der γ -H2AX-Assay	9
1.5. Aktueller Stand der Forschung	10
2. Zielsetzung	11
3. Materialien und Methoden	12
3.1. Durchführung PET-CT, PET-MRT und MRT	12
3.1.1. Durchführung am PET-CT (SA1)	13
3.1.2. Durchführung am PET-MRT (SA2 und SA3)	14
3.2. Untersuchte Parameter	15
3.3. Probanden	16
3.4. Geräte	17
3.4.1. Verwendete Geräte zur Durchführung der Probandenuntersuchung und der Isolierung der Lymphozyten	17
3.4.2. Verwendete Geräte zur Durchführung des γ -H2AX-Assays	18
3.5. Isolierung und Fixierung der Lymphozyten aus dem Vollblut	19
3.5.1. Reagenzien	19
3.5.2. Reagenzienvorbereitung	19
3.5.3. Durchführung	19
3.6. Durchführung des γ -H2AX-Assays	22
3.6.1. Reagenzien	22
3.6.2. Reagenzienvorbereitung	22
3.6.3. Durchführung	22
3.7. Erhebung der Foci	24
3.8. Statistische Auswertung	25

3.8.1. Hypothesen	25
3.8.2. Fragestellungen	25
4. Ergebnisse	27
4.1. Stichprobenbeschreibung.....	27
4.2. Einfluss der Inkubationszeit auf die Ergebnisse.....	28
4.3. Einfluss des Topogramms in SA1 oder des MRT-Bilddatensatzes für die Transmissionskorrektur in SA2	29
4.4. Feststellung des Inkubationszeitpunktes mit dem größten Expositionseffekt.....	30
4.5. Effekt der Exposition mit [¹⁸ F]FDG, [¹⁸ F]FDG + B ₀ oder B ₀ auf die Anzahl an Strahlenschäden	32
4.6. Auftreten eines synergistischen Effekts durch die kombinierte Exposition von FDG + B ₀ gegenüber einer Exposition mit FDG oder B ₀ allein	34
5. Diskussion	36
5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	36
5.2. Diskussion der Methoden	37
5.2.1. Die Stichprobenzusammensetzung	37
5.2.2. Der γ -H2AX-Assay zur Beurteilung der Doppelstrangbrüche	37
5.2.3. Durchführung der Probandenuntersuchungen am Klinikum rechts der Isar.....	38
5.3. Diskussion der Ergebnisse und der Vergleich mit anderen Studien.....	40
5.4. Ausblick auf künftige Studien	44
6. Literaturverzeichnis.....	45
7. Abkürzungsverzeichnis.....	48
8. Abbildungsverzeichnis	50
9. Tabellenverzeichnis	52
10. Einstellungen an PET-CT und PET-MRT.....	53
10.1. PET-CT.....	53
10.2. PET-MRT mit FDG-Injektion	54
10.3. PET-MRT ohne FDG-Injektion.....	56

11. Danksagung	58
12. Anhang	59
12.1. Ergänzende Abbildungen.....	59
12.2. Ergänzende Tabellen.....	60
12.3. Einstellungen der Geräte.....	64
12.3.1. Einstellung zur Rekonstruktion der Bilder am PET-MRT	64
12.3.2. Einstellung zur Rekonstruktion der Bilder am PET-CT	65
12.3.3. Einstellungen des Classifiers für Metafer (Version 3.13.1).....	66

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

Jedes Individuum ist im Alltag permanent terrestrischer und kosmischer Strahlung ausgesetzt. Während erstere durch Radionuklide, welche sich im Erdboden befinden, verursacht wird, setzt sich letztere aus einer primären, sekundären und solaren Strahlungskomponente zusammen. Terrestrische und kosmische Strahlenexposition ergeben in Deutschland eine durchschnittliche jährliche natürliche Strahlenbelastung von 0,0021 Sv (entspricht 2,1 mSv)(Bundesamt für Strahlenschutz, 2019b; Krieger, 2012).

Energiereiche Strahlung kann bei Säugern unter bestimmten Umständen zu Mutationen führen. Durch die ionisierende Strahlung können Radikale entstehen, welche in der Lage sind, Einzel- beziehungsweise Doppelstrangbrüche oder Veränderungen einzelner Nukleobasen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu setzen. Einzelstrangbrüche oder Basenveränderungen führen seltener zu Mutationen, da die Zellen mittels spezifischer Reparaturmechanismen in der Lage sind den beschädigten DNA-Strang zu reparieren (Graw, 2015).

Doppelstrangbrüche sind für eukaryotische Zellen weitaus gefährlicher, da sie entweder zu Chromosomenumlagerungen oder zum Verlust von Chromosomenstücken führen. Als Folge kann es zum geordneten Zelltod (Apoptose) oder zu Entartungen kommen (Paull et al., 2000; Rothkamm et al., 2003). Während es sich bei Doppelstrangbrüchen und Basenveränderungen um genetische Wirkungen der Strahlenexposition handelt, gibt es ebenfalls somatische (körperliche) Wirkungen, die bei akuter Strahlenbelastung auftreten können (Tabelle 1) (Graw, 2015).

Tabelle 1: Überblick der Folgen akuter Strahlenbelastung des ganzen Körpers (in Anlehnung an (Bundesamt für Strahlenschutz, 2019a)).

Dosis [mSv]	Sofortfolgen	Spätfolgen
500	Hautrötung bei akuter Exposition	
1000	Übelkeit, Erbrechen, Müdigkeit	
3000 - 4000	Übelkeit, Erbrechen, Durchfall	unbehandelt in 50% der Fälle nach 3-6 Wochen letal
> 8000	sofortige Zerstörung des Nervensystems	geringe Überlebenschancen ohne medizinische Behandlung

Seit der Entdeckung der Röntgenstrahlung um 1900 durch Wilhelm Conrad Röntgen wird ionisierende Strahlung auch in der medizinischen Diagnostik und Therapie verwendet. Heutzutage zum Beispiel durch konventionelle Röntgenaufnahmen, bei der Angiografie oder bei der Computertomographie (CT).

Die daraus entstehende Strahlenexposition wird zivilisatorische Strahlenexposition genannt und verursacht eine effektive Dosis von ungefähr 1,7 mSv pro Jahr in Deutschland (Bundesamt für Strahlenschutz, 2019b). Die effektive Dosis der Strahlung unterscheidet sich je nach Körperregion, Dauer und Art der Untersuchung (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht der effektiven Dosis verschiedener medizinischer Untersuchungen (in Anlehnung an (Bundesamt für Strahlenschutz, 2018; Krause et al., 2007)).

Untersuchung	effektive Dosis [mSv]
Röntgenaufnahme von Extremitäten	< 0,01 – 0,10
Röntgenaufnahme des Brustkorbs (eine Aufnahme)	0,02 – 0,04
Röntgenaufnahme des Bauchraums (Abdomenübersicht)	0,30 – 0,70
zahnärztliche Röntgenaufnahme	< 0,01
Röntgendurchleuchtung (Angiographie)	10-30
CT Hirnschädel	1 – 3
CT Brustkorb	4 – 7
CT Abdomen	8 – 20
PET (Positronen-Emissions-Tomographie) bei 350 MBq [¹⁸ F]FDG	6,70
MRT (Magnetresonanztomographie)	0,00

1.2. Das Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie und der Magnetresonanztomographie

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) basiert auf der Verarbeitung eines Signals, welches bei der Detektion von definierter Strahlung entsteht. Hierfür wird dem Patienten ein radioaktiv markierter Tracer injiziert. Die Detektion erfordert die Verwendung eines Isotops, bei dessen Zerfall eine β^+ -Strahlung (Positronen-emittierende Strahlung) freigesetzt wird. Hierbei wird im Rahmen des Zerfallsprozesses ein Proton (p^+) des Atomkerns unter Aussendung eines sogenannten Positrons (e^+) in ein Neutron (n^0) umgewandelt (Delso et al., 2015).

Bei Positronen handelt es sich um das antimaterielle Gegenstück zu Elektronen (e^-). Das abgegebene Positron wandert in der Regel einige Millimeter im Raum, bis es auf ein Elektron trifft. Hierdurch kommt es zur Vereinigung von Materie (e^-) und Antimaterie (e^+), was in der sogenannten Annihilation resultiert. Infolge dieses Prozesses kommt es zur kompletten Umwandlung von Masse in Energie in Form von Aussendung zweier γ -Quanten mit einer Energie von je 511 keV (Kiloelektronenvolt) im Winkel von 180° (Delso et al., 2015; Standke, 2002).

Ein PET-Scanner, welcher aus einer zirkulären Anordnung vieler kleiner Detektorflächen besteht, zeichnet das Auftreffen von γ -Quanten auf. Allerdings kommt es lediglich bei einem Auftreffen innerhalb eines kurzen Zeitfensters (15 Nanosekunden (ns)) der beiden γ -Quanten an gegenüberliegenden Polen im Winkel von exakt 180° (Koinzidenz) zu einem gültigen Signal (Standke, 2002). Durch Software-Algorithmen kann daraus der Ort der Annihilation berechnet werden, welcher räumlich sehr nahe am eigentlichen Ort des Tracers einzuordnen ist. Ist der zeitliche Abstand zwischen dem Auftreffen zweier γ -Quanten am Scanner zu lange (über 15 ns) oder der Winkel nicht exakt 180° , so werden diese γ -Quanten als Fehlmeldungen detektiert und nicht weiterverarbeitet (Delso et al., 2015; Standke, 2002).

Die Anwendungsgebiete der PET-Bildgebung reichen von der Onkologie zur Tumordetektion über die Kardiologie zur Beurteilung der Herzdurchblutung bis hin zur Fragestellung neurologischer Erkrankungen (Torigian et al., 2013). Ein Grund für das große Spektrum der Untersuchungsmöglichkeiten ist die Vielzahl vorhandener hoch spezifischer Tracer, zum Beispiel [^{18}F]Fluorodesoxyglukose ([^{18}F]FDG) zur Darstellung des Glukosemetabolismus oder Pseudopeptide für die Bildgebung verschiedener Geweberezeptoren.

Die Funktionsweise der Magnetresonanztomographie (MRT) beruht auf der Eigenschaft, dass Kerne von Wasserstoffatomen einen Spin, also eine Drehbewegung, besitzen. Diese Drehbewegung wird durch die molekulare Masse des Atoms zu einem Drehimpuls. Das Wasserstoffatom stellt sich im Periodensystem der Elemente als ^1H dar. Dies bedeutet, dass das Wasserstoffatom als Kern nur ein Proton besitzt, um welches ein Elektron in der Atomhülle kreist. Das Proton dreht sich um seine eigene Achse und

besitzt somit einen Drehimpuls und eine rotierende elektrische Ladung. Mit diesen Eigenschaften verhält sich das Wasserstoffatom wie ein Kreisel mit einem kleinen Magneten, der von außen angelegter magnetischer Ladung beeinflusst werden kann (Delso et al., 2015; Weishaupt et al., 2014).

Durch ein äußerlich angelegtes, starkes Magnetfeld werden die Protonen parallel in eine Richtung ausgerichtet. Im Kontakt mit dem Magnetfeld reagieren die Protonen mit einer Ausweichbewegung einer bestimmten Frequenz (Larmorfrequenz), welche proportional zur Stärke des Magnetfelds ist. Unter Abgabe von Energie richten sich die Spins der Protonen allmählich parallel zum Magnetfeld aus (Delso et al., 2015; Weishaupt et al., 2014). Mit einem Hochfrequenz-Impuls der richtigen Leistung und Dauer kann anschließend eine Auslenkung der Spins in einem bestimmten Winkel erreicht werden. Dieser Vorgang wird auch als Larmorpräzession bezeichnet, wodurch das Spinsystem angeregt wird. Der magnetische Summenvektor dreht sich und es entsteht an der Empfangsspule eine Wechselspannung, welche der Larmorfrequenz entspricht. Dies ist das gemessene MR (Magnetresonanz)-Signal, welches mit entsprechender Computersoftware weiterverarbeitet wird. Nach Abschluss des Impulses richten sich die Protonen unter Abgabe von Energie wieder parallel entlang des starken Magnetfeldes aus, sie gelangen zurück in die Ausgangsposition (Delso et al., 2015; Weishaupt et al., 2014).

Die MRT-Untersuchung wird im medizinischen Alltag oft genutzt, da sie im Gegensatz zu anderen Bildgebungsvarianten ohne Röntgenstrahlung durchgeführt wird. Sie eignet sich vor allem zur Darstellung von Weichteilgeweben, wie zum Beispiel Muskulatur, Gehirn oder innere Organe.

1.3. PET-MRT- und PET-CT-Hybridgeräte

Die PET, sowie auch die MRT sind in den 1950er Jahren entwickelt worden und werden seit den 1970er Jahren für die Medizin genutzt. Als eigenständige Untersuchungen sind sie schon lange im Klinikalltag präsent (Delso et al., 2015; Salyga et al., 2016). Ein Nachteil der PET-Bilder ist das Fehlen der räumlichen und anatomischen Information zu den Bildern, es werden nur die Orte des größten Zerfalls an Aktivität aufgezeichnet (Schulthess, 2016; Standke, 2002). Aus diesem Grund ist die PET-CT, ein Hybridgerät aus PET-Scanner und CT, entwickelt worden. PET-CT-Geräte sind seit 2001 im klinischen Alltag etabliert (Salyga et al., 2016). Die CT arbeitet mit Röntgenstrahlung. Im runden CT-Gerät sind sowohl eine Hochleistungsröntgenröhre und gegenüberliegend viele eng aneinander liegende Detektoren angeordnet. Der Patient liegt in der Mitte der Röhre auf dem Untersuchungstisch, wird von dem runden Arm des CT-Gerätes umkreist und mithilfe der Röntgenstrahlung untersucht. Dadurch ist es möglich, 360°-Röntgenaufnahmen des Patienten zu erstellen, welche das Computersystem zu einem Schnittbild verarbeitet (Bundesamt für Strahlenschutz, 2019c; Krause et al., 2007; Schulthess, 2016). Relativ neu ist die Verbindung aus PET-Scanner und MRT-Gerät in einer Apparatur, da sie erst seit 2010 als Teil der klinischen Untersuchung in der Nuklearmedizin etabliert ist (Salyga et al., 2016). Durch die Kombination von PET und MRT beziehungsweise CT in den Hybridgeräten ist eine hohe räumliche und anatomische Korrelation zu den Zerfallsinformationen gegeben, wodurch sich die Qualität der Untersuchung steigert. (Salyga et al., 2016; Standke, 2002).

Der Vorteil der PET-MRT-Hybridgeräte gegenüber den PET-CT-Hybridgeräten liegt in der besseren Darstellung von Weichteilorganen durch die MRT und die geringere Dosis an ionisierender Strahlung, da die MRT-Untersuchung mithilfe von Magnetwellen im Gegensatz zu Röntgenstrahlung der CT-Untersuchung arbeitet (Ehman et al., 2017; Salyga et al., 2016). Bei der PET-MRT-Untersuchung ist der Patient alleinig der Dosis ionisierender Strahlung durch den injizierten Tracer ausgesetzt.

1.4. Der γ -H2AX-Assay

Der γ -H2AX-Assay erlaubt die Darstellung von bereits ereigneten Doppelstrangbrüchen der DNA in Lymphozyten. Da die DNA entspiralisierter Chromosomen eukaryotischer Zellen eine Länge von circa 2 m aufweisen würde, bedarf es bestimmter Mechanismen, um die DNA auf sogenannte Histone aufzuwickeln und so auf kleinstem Raum zu verpacken (Buselmaier, 2015). Um potenzielle DNA-Schäden zu erkennen, zu markieren und zu reparieren, müssen Änderungen in der Chromatin-Struktur vorgenommen werden, sodass der Zugang zu der dicht verpackten DNA ermöglicht wird. Mechanismen dieser Änderung sind unter Anderem Adenosintriphosphat (ATP) -abhängiges Chromatin-Modelling, der Austausch von Histon-Varianten oder die kovalente Veränderung von Histonen durch zum Beispiel Acetylierung, Deacetylierung oder Phosphorylierung (Foster & Downs, 2005). Letzteres stellt die Basis des γ -H2AX-Assays dar. H2AX ist ein Histon der H2A-Familie, welches für die Verpackung und Organisation eukaryotischer DNA zuständig ist. Nach der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen kommt es innerhalb von Minuten zur Phosphorylierung von H2AX, welches schließlich γ -H2AX genannt wird. In der DNA-Reparatur übernimmt γ -H2AX zwei wichtige Funktionen. Zum einen ist es für die korrekte Anordnung notwendiger Reparaturkomplexe in der Umgebung des DNA-Schadens zuständig und zum anderen fixiert es die Bruchenden. Zusammen mit Reparaturproteinen bildet γ -H2AX Komplexe, die den Zellzyklus als Checkpoint-Proteine regulieren. Diese Komplexe sind anschließend als nukleäre Foci nachweisbar.

Die Foci können mithilfe von zwei Antikörpern dargestellt werden. Der erste Antikörper bindet spezifisch an die phosphorylierte Markierung des Doppelstrangbruches, während der zweite Antikörper als Fluoreszenzfarbstoff für den ersten Antikörper fungiert und somit der Darstellung der Foci dient (Foster & Downs, 2005; Podhorecka et al., 2010; Rothkamm & Horn, 2009).

1.5. Aktueller Stand der Forschung

Eine große Anzahl an Studien befasste sich mit der Auswirkung ionisierender Strahlung auf die DNA. *Piechowiak et al.* analysierten die Auswirkung von Kontrastmittelgabe auf die Anzahl von Doppelstrangbrüchen *in vivo* in humanen Lymphozyten bei Durchlaufen eines Thorax-CTs mittels γ -H2AX-Assay und manueller Auszählung der Doppelstrangbrüche (*Piechowiak et al.*, 2015). Es zeigte sich, ein Anstieg der generierten Foci nach der Anwendung des Thorax-CTs im Vergleich zur Blutentnahme vor der Untersuchung. Bei Kontrastmittelgabe war die Zahl generierter Foci deutlich größer als bei den Probanden mit nativen Aufnahmen. *Löbrich et al.* beschäftigten sich mit der Entwicklung, Reparatur und Feststellung von Doppelstrangbrüchen nach CT-Untersuchungen mithilfe des γ -H2AX-Assays (*Löbrich et al.*, 2005). Sie stellten bei ihren Probanden einen Anstieg der Doppelstrangbrüche nach der CT-Untersuchung fest.

Auf der anderen Seite wurde auch die Auswirkung von Magnetfeldern auf humane Lymphozyten bereits bearbeitet. Ein Beispiel hierfür ist die *in vitro*-Studie zur Messung von Doppelstrangbrüchen und Zelltoxizität mittels γ -H2AX-Assay und CellTiter-Blue® Cell Viability Assay nach Exposition isolierter, nicht stimulierter humaner Lymphozyten in einem 7-Tesla-Magnetfeld (*Reddig et al.*, 2015). Dabei wurde von *Reddig et al.* kein Anstieg von Doppelstrangbrüchen bei der Behandlung der Zellen mit dem Magnetfeld festgestellt. *Lancellotti et al.* befassten sich mit der Frage biologischer Effekte eines kardialen MRTs ohne Kontrastmittel bei einer Magnetfeldstärke von 1,5 Tesla (T) auf humane Blutzellen. Die Lymphozyten der 20 gesunden Probanden wurden mittels γ -H2AX-Assay und Durchflusszytometrie auf Doppelstrangbrüche und Apoptose untersucht. Dabei konnte ein bis zwei Stunden nach Durchführung des MRTs kein Anstieg von DNA-Schäden festgestellt werden. Zwei Tage bis einen Monat nach der Untersuchung war eine erhöhte Doppelstrangbruchrate für T-Lymphozyten und natürliche Killer-Zellen darstellbar. Dieser Effekt war nach einem Jahr bei 12 Probanden mit Kontrolluntersuchung nicht mehr nachweisbar (*Lancellotti et al.*, 2015).

Die Bewertung der Risiken von PET- und MRT-Untersuchungen anhand biophysikalischer und biologischer Ansatzpunkte ist bereits durch *Brix et al.* erfolgt, hierbei wurden die Risiken von PET- und MRT-Untersuchung getrennt voneinander und nicht die Kombination des PET-MRTs betrachtet (*Brix et al.*, 2009). *Hintenlang et al.* befassten sich bereits 1993 mit der Messung synergistischer Effekte ionisierender Strahlung durch [^{137}Cs]Caesium und einem 60 Hz Magnetfeldes *in vitro* an humanen Lymphozyten anhand der Rate tetraploider Komplementen in Chromosomen. Dies ist jedoch nicht mit dem Ablauf einer PET-MRT-Untersuchung kohärent, bei der [^{18}F]FDG und ein 3 T Magnetfeld (in der erwähnten Arbeit maximal 1,4 mT) verwendet werden. Das Ergebnis lautete, dass niederfrequente Magnetfelder in Anwesenheit vorausgehender zelluläre Mechanismen diese beeinflussen und zur Bildung tetraploider Chromosomen führen können (*Hintenlang*, 1993).

2. Zielsetzung

Ziel der Studie ist die Untersuchung eines eventuellen Bestehens synergistischer Effekte zwischen ionisierender Strahlung und einem statischen Magnetfeld bei PET-MRT-Untersuchungen. Die ionisierende Strahlung der PET-MRT-Untersuchung wird durch das Radiopharmakon verursacht. Bei dem statischen Magnetfeld handelt es sich um ein starkes und homogenes Magnetfeld mit einer Flussdichte von 3 T. PET-MRT-Untersuchungen finden immer mehr Verwendung im klinischen Alltag. Bisherige Studien befassen sich allerdings entweder mit den Risiken und Effekten ionisierender Strahlung bei CT-Untersuchungen oder den Risiken und Effekten der magnetischen Strahlung bei MRT-Untersuchungen. Die synergistischen Effekte aus Magnetfeld und ionisierender Strahlung, wie sie in der Nuklearmedizin bei den PET-MRT-Untersuchungen auftreten, sind derzeit noch nicht ausreichend erforscht. Statische Magnetfelder besitzen an sich kein genotoxisches Potential, allerdings können sie Moleküle, zum Beispiel Enzyme, so ausrichten, dass ein Einfluss auf DNA-Reparaturprozesse ermöglicht wird (Brix et al., 2009). Die ionisierende Strahlung wiederum vermag Doppelstrangbrüche zu setzen, die *in vivo* repariert werden müssen. Um diese Effekte zu quantifizieren, wurden Doppelstrangbrüche an Lymphozyten-DNA gesunder Probanden untersucht. Langfristig soll diese Studie zur strahlenhygienischen Bewertung der PET-MRT-Untersuchung beitragen.

Zur Erfassung der synergistischen Effekte wurden die Probanden in drei Studienarme aufgeteilt:

- Studienarm 1 (SA1) durchlief eine PET-CT-Untersuchung mit dem Radiopharmakon [¹⁸F]FDG. Diese Gruppe stellte die alleinige Wirkung des PET-Tracers dar.
- Studienarm 2 (SA2) durchlief eine PET-MRT-Untersuchung mit dem Radiopharmakon [¹⁸F]FDG. Diese Gruppe stellte die potenziell synergistische Wirkung des Tracers und des Magnetfeldes B₀ dar.
- Studienarm 3 (SA3) befand sich lediglich im Magnetfeld des PET-MRT-Gerätes. Diese Gruppe stellte die alleinige Wirkung des Magnetfeldes B₀ dar, da keine Injektion des Radiopharmakons vorgenommen wurde.

Es wurden die Lymphozyten aus dem Probandenblut isoliert, mittels γ -H2AX-Assay Doppelstrangbrüche dargestellt und Foci ermittelt.

3. Materialien und Methoden

3.1. Durchführung PET-CT, PET-MRT und MRT

Tabelle 3: Übersicht über den Studienablauf. Erklärung der Zeichen: *1 der Lymphozyten, *2 bei 37 °C im Wasserbad.

	PET-CT (SA1)	PET-MRT (SA2)	MRT (SA3)
Blutentnahme 1 (BE1)	sofortige Isolierung und Fixierung* ¹ (BE1 ₀) 60 min Inkubation* ² , dann Isolierung und Fixierung* ¹ (BE1 ₆₀)		
	Topogramm	MRT zur Transmissionskorrektur	Liegezeit im Magnetfeld (60 min)
Blutentnahme 2 (BE2)	60 min Inkubation* ² , dann Isolierung und Fixierung* ¹ (BE2 ₆₀)		sofortige Isolierung und Fixierung* ¹ (BE2 ₀) 15 min Inkubation* ² , dann Isolierung und Fixierung* ¹ (BE2 ₁₅) 30 min Inkubation* ² , dann Isolierung und Fixierung* ¹ (BE2 ₃₀) 45 min Inkubation* ² , dann Isolierung und Fixierung* ¹ (BE2 ₄₅) 60 min Inkubation* ² , dann Isolierung und Fixierung* ¹ (BE2 ₆₀)
	FDG-Injektion		-
	PET (60 min)		-
Blutentnahme 3 (BE3)	sofortige Isolierung und Fixierung der Lymphozyten (BE3 ₀) 15 min Inkubation* ² , dann Isolierung und Fixierung* ¹ (BE3 ₁₅) 30 min Inkubation* ² , dann Isolierung und Fixierung* ¹ (BE3 ₃₀) 45 min Inkubation* ² , dann Isolierung und Fixierung* ¹ (BE3 ₄₅) 60 min Inkubation* ² , dann Isolierung und Fixierung* ¹ (BE3 ₆₀)		-
	Low-Dose-CT	-	-

3.1.1. Durchführung am PET-CT (SA1)

Nach Durchführung der ersten Blutabnahme wurde zuerst ein Topogramm mit einer Spannung von 80 kV, einem Röhrenstrom von 20 mA und einem Dosis-Längen-Produkt (DLP) von $1,67 \pm 0,47$ mGy \times cm gefahren. Anhand des Topogramms konnte die PET auf Höhe der Nieren geplant und die Dosis für die Low-Dose-CT berechnet werden. Anschließend erfolgte die zweite Blutentnahme. Das Radiopharmakon [^{18}F]FDG wurde gewichtsadaptiert (4,3 MBq pro kg Körpergewicht) vorbereitet, wobei maximal 350 MBq verabreicht wurden. Nach Abschluss des Topogramms wurde [^{18}F]FDG dynamisch injiziert. Dies bedeutet zeitgleich mit der Injektion wurde eine dynamische PET-Aufnahme über der Abdomen-Region für 60 min gestartet.

Nach der dritten Blutentnahme in SA3 wurde im Anschluss an die PET noch eine Low-Dose-CT mit einer Spannung von 120 kV, einem Strom-Zeit-Produkt von 25 mAs und einem Dosis-Längen-Produkt von $48,33 \pm 15,33$ mGy \times cm gefahren. Das DLP des Topogramms, sowie der Low-Dose-CT sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: DLP des Topogramms vor der ersten Blutentnahme, sowie des Low-Dose-CTs im Anschluss an die dritte Blutentnahme.

	DLP in mGy \times cm
Topogramm	$1,67 \pm 0,47$
Low-Dose-CT	$48,33 \pm 15,33$

Es folgte die Rekonstruktion der Bilddatensätze anhand Tabelle 5. Einstellungen: OSEM (Rekonstruktionsverfahren), drei Iterationen, 21 Subsets, Matrix: 172, Zoom: 1,0 und Gauss-Filter FWHM (Full Width- Half Maximum) 2,0 mm.

Tabelle 5: Rekonstruierte Bilder pro Zeitabschnitt der PET-Untersuchungen.

Minute der PET-Untersuchung	Zeit zwischen den Bildern (s)	Anzahl der Bilder
1	5	12
2	10	6
3 – 5	30	6
6 – 30	60	25
31 – 60	300	6
Gesamt	3600	55

3.1.2. Durchführung am PET-MRT (SA2 und SA3)

Hierfür wurde zuerst eine Schwächungskorrektur in T1-gewichteter DIXON-Vibe gefahren. Zur darauffolgenden zweiten Blutabnahme wurden die Probanden aus dem Scanner gefahren und anschließend wieder auf der gleichen Position im Scanner platziert. Ebenfalls wurde das [^{18}F]FDG gewichtsadaptiert (4,3 MBq pro kg Körpergewicht) vorbereitet. Die Injektion des Tracers fand dynamisch unter gleichzeitigem Starten des PETs im List-Mode, welches auf Höhe der Nieren geplant wurde statt. Die Dauer des PETs betrug 60 min.

Es folgte die Rekonstruktion der Bilddatensätze anhand Tabelle 5 ebenfalls mit den Einstellungen OSEM, drei Iterationen, 21 Subsets, Matrix: 172, Zoom: 1,0 und Gauss-Filter FWHM 2,0 mm.

Die Durchführung der Untersuchung des SA3 fand identisch zu der des SA2 statt, allerdings wurde kein [^{18}F]FDG injiziert und es wurde kein PET-Bilddatensatz erhoben.

3.2. Untersuchte Parameter

Es wurde die Anzahl an Doppelstrangbrüchen zu verschiedenen Zeitpunkten der Untersuchungen gemessen. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Probanden nüchtern. Die letzte Nahrungs- oder Flüssigkeitsaufnahme war vor mindestens sechs Stunden erfolgt. Den Probanden wurde in der PET-CT-Gruppe (SA1) und der PET-MRT-Gruppe (SA2) dreimal Blut abgenommen und dieses für verschiedene Zeitspannen inkubiert. In der MRT-Gruppe (SA3) fanden nur zwei Blutabnahmen statt.

Der Ablauf der Untersuchungen mit Gabe eines radioaktiven Tracers ist im Folgenden beschrieben.

- Die erste Blutabnahme (BE) von jeweils zwei Lithium-Heparin S-Monovetten® à 7,5 ml erfolgte vor der Untersuchung. Ein Röhrchen wurde sofort bei 5 °C gekühlt (BE1₀), das andere für 60 min bei 37 °C inkubiert (BE1₆₀).
- Die zweite Blutabnahme von einer Lithium-Heparin S-Monovette® à 7,5 ml Blut erfolgte nach dem Topogramm des PET-CT-Arms beziehungsweise der Messung der Attenuation Correction (AC, MRT-basierte Schwächungskorrektur) des PET-MRT-Arms. Dieses Röhrchen wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert (BE2₆₀).
- Die dritte Blutabnahme erfolgte 60 min nach Injektion von [¹⁸F]FDG mit drei Lithium-Heparin S-Monovetten® à 7,5 ml. Das entnommene Volumen wurde auf fünf Proben verteilt, welche entweder sofort gekühlt (BE3₀) oder für 15 min (BE3₁₅), 30 min (BE3₃₀), 45 min (BE3₄₅) oder 60 min (BE3₆₀) bei 37 °C inkubiert und anschließend gekühlt wurden.

Der Ablauf der reinen MRT-Gruppe ist im Folgenden aufgelistet.

- Die erste Blutabnahme von jeweils zwei Lithium-Heparin S-Monovetten® à 7,5 ml erfolgte vor der Untersuchung. Ein Röhrchen wurde sofort bei 5 °C gekühlt (BE1₀), das andere für 60 min bei 37 °C inkubiert (BE1₆₀).
- Die zweite Blutabnahme erfolgte nach 60 min Liegezeit im Magnetfeld mit drei Lithium-Heparin S-Monovetten® à 7,5 ml. Das entnommene Volumen wurde auf fünf Proben verteilt, welche entweder sofort gekühlt (BE2₀) oder für 15 min (BE2₁₅), 30 min (BE2₃₀), 45 min (BE2₄₅) oder 60 min (BE2₆₀) bei 37 °C inkubiert und anschließend gekühlt wurden.

Die Proben der ersten und zweiten Blutabnahme der Gruppen mit Injektion von [¹⁸F]FDG beziehungsweise der ersten Blutabnahme in der reinen MRT-Gruppe wurden gemeinsam isoliert, genauso wie die Proben der dritten ([¹⁸F]FDG-Gabe) beziehungsweise zweiten (MRT-Gruppe) Blutentnahme. Somit wurde sichergestellt, dass Proben mit ionisierender Strahlung räumlich getrennt von Proben ohne ionisierende Strahlung aufbewahrt wurden. Der Studienablauf ist in Tabelle 3 dargestellt.

3.3. Probanden

Mittels des Statistik-Programms SigmaStat (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) konnte ermittelt werden, dass bei einer Power von 0,8 und einem Signifikanzniveau von 0,05 pro Studienarm 10 Probanden erforderlich sind, um die Prüfhypothese mittels Kruskal-Wallis Test abzulehnen oder zu bestätigen. Um einen Ausfall in den Studienarmen zu berücksichtigen, wurden pro Arm 12 Probanden untersucht.

Die freiwilligen Probanden für die Untersuchungen wurden über ausgehängte Flyer (Ergänzende Abbildung 1) angeworben. Voraussetzung für die Teilnahme war ein Alter zwischen 20 bis 35 Jahren. Wohingegen Ausschlusskriterien diverse Krankheitsbilder (zum Beispiel ein aktives Tumorleiden), eine Schwangerschaft, die Teilnahme an weiteren Studien die mit Injektion eines radioaktiven Tracers verbunden waren oder eine berufliche Strahlenexposition von mehr als 7 mSv Ganzkörperexposition im letzten Jahr waren. Dadurch konnten eine im Vergleich zur Normalpopulation erhöhte Anzahl an Doppelstrangbrüchen und ein erhöhtes Risiko für der Teilnahme für die Probanden ausgeschlossen werden. Probanden mit Erkrankungen der Schilddrüse, ebenso wie Raucher wurden in die Studie miteingeschlossen. Die Einnahme der Medikamente belief sich in den Probandengruppen auf diverse Präparate zur hormonellen Verhütung, L-Thyroxin und Jodthyroxin.

Es war den Probanden selbst überlassen, in welchen Studienarm sie eingeteilt werden wollten, jedoch wurde auf eine gleichmäßige Verteilung weiblicher und männlicher Probanden je Studienarm geachtet. Die Abgabe einer Einverständniserklärung und die Aufklärung durch einen Arzt vor der jeweiligen Untersuchung waren obligat. Ein Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München lag vor.

Das Durchschnittsalter der Probanden der MRT-Gruppe betrug $25,1 \pm 2,1$ Jahre (acht weibliche, vier männliche Teilnehmer). Das Durchschnittsalter der Probanden der PET-MRT-Gruppe betrug $24,8 \pm 2,6$ Jahre (fünf weibliche, fünf männliche Teilnehmer). Das Durchschnittsalter der Probanden der PET-CT-Gruppe betrug $26,0 \pm 2,9$ Jahre (fünf weibliche, fünf männliche Teilnehmer).

Ergänzende Tabelle 1 stellt die Zuordnung der Probanden sowie detailliert die Zusammensetzung der jeweiligen Studienarme dar. Den Probanden wurden dreistellige Zufallszahlen zur Anonymisierung zugeordnet.

3.4. Geräte

3.4.1. Verwendete Geräte zur Durchführung der Probandenuntersuchung und der Isolierung der Lymphozyten

Tabelle 6: Verwendete Geräte zur Durchführung der Probandenuntersuchung und der Isolierung der Lymphozyten.

Produkt	Firma
PET-CT-System	Biograph mCT, Siemens Healthineers, Erlangen, Deutschland
PET-MRT- System	Biograph mMR, Siemens Healthineers, Erlangen, Deutschland
Centrifuge 5702 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Universalzentrifuge Heraeus® Megafuge® 1.0 R	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Thermo Scientific™ Midi 40 CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Schüttelwasserbad 1092	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Wasserbad Julabo 13	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Leucosep Röhrchen 12 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Leucosep Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Safety-Multifly®-Kanüle 21 G (Gauge), 200 mm lang	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 7.5ml Lithium Heparin	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Vasofix® Safety Braunüle G18, 1,30 × 45 mm, grün	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Vasofix® Safety Braunüle G20, 1,10 × 33 mm, rosa	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Akkubetriebene Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland

3.4.2. Verwendete Geräte zur Durchführung des γ -H2AX-Assays

Tabelle 7: Verwendete Geräte zur Durchführung des γ -H2AX-Assays.

Produkt	Firma
Combitips advanced 1 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Combitips advanced 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Akkubetriebene Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Multipette stream	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
SUB Aqua Pro Wasserbad 2 l	Grant, Cambridge, Vereinigtes Königreich von Großbritannien und Nordirland
Safe 2020 biologische Sicherheitswerkbänke der Klasse II	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortex Reagenzglasmixer 7-2020	NeoLab Migge GmbH, Berlin, Deutschland
Hettich Rotofix 32/A Centrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
IKAMAG RCT	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
IKA Minishaker MS1	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Einweg-Zytokammer mit weißer Filterkarte für 0,5 ml	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Spann-Klipp für Zytokammern	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Axio Imager 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Objektiv EC Plan-Neofluar 40x/0,75	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Metafer - Automatische Bildaufnahme- und Analyseplattform (Version 3.13.1)	MetaSystems Hard & Software GmbH, Altluss- heim, Deutschland

3.5. Isolierung und Fixierung der Lymphozyten aus dem Vollblut

Die Isolierung und Fixierung der Lymphozyten, sowie das Durchführen des γ -H2AX-Assays wurde anhand eines modifizierten Protokolls nach *Greve et al.* (Greve et al., 2012) durchgeführt.

3.5.1. Reagenzien

Tabelle 8: Reagenzien zur Isolation und Fixierung von Lymphozyten aus Vollblut.

Produkt	Firma
Histopaque-1077 (Dichte 1,077 g/ml)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Deutschland
RPMI 1640, w: stable Glutamine, w: 2.0 g/L NaHCO ₃	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
PBS Dulbecco ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Paraformaldehyd (pFA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Deutschland
Türks Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland

3.5.2. Reagenzienvorbereitung

Zur Herstellung von 4 % Paraformaldehyd (pFA) wurden 1 g pFA in 25 ml PBS vermischt und im Wasserbad bei 72 °C für circa 30 min aufgelöst. RPMI 1640 und Histopaque-1077 wurden aus dem Kühlschrank genommen, um beide auf Raumtemperatur zu erwärmen.

3.5.3. Durchführung

Vor Beginn der Untersuchung wurde die Zentrifuge auf 5 °C gekühlt. Es wurden 3 ml beziehungsweise 15 ml Histopaque-1077 in 12 ml beziehungsweise 15 ml Leucosep-Röhrchen pipettiert (abhängig von der Menge an Vollblut). Für mehr als 6,5 ml Vollblut musste die größere Menge Histopaque und das größere Leucosep-Röhrchen verwendet werden. Die Röhrchen wurden für eine Minute bei 1000 g (Erdbeschleunigung) und 5 °C zentrifugiert, so dass die Lösung den Filter passiert.

Den Probanden wurde ein venöser Zugang via Vasofix® Safety Braunüle (G 18, 1,30 × 45 mm, grün) oder Vasofix® Safety Braunüle (G 20, 1,10 × 33 mm, rosa), je nach Venenverhältnissen, an einen Arm für die Injektion des Radiopharmakons gelegt. Das Blut für die Gewinnung der Lymphozyten wurde am anderen Arm entweder über eine Safety-Multifly®-Kanüle (G 21, 200 mm lang) oder ebenfalls über eine Venenverweilkanüle Vasofix® Safety Braunüle (G 18, 1,30 × 45 mm, grün) oder Vasofix® Safety Braunüle (G 20, 1,10 × 33 mm, rosa), je nach Venenverhältnissen, in S-Monovetten® 7.5 ml Lithium-

Heparin gewonnen. Es musste darauf geachtet werden, kein Blut aus dem Zugang der [¹⁸F]FDG-Injektion zu entnehmen, um eine Kontamination der Blutprobe mit dem Radiopharmakon zu vermeiden. Das abgenommene Blut wurde in die vorbereiteten Leucosep-Röhrchen pipettiert und für 10 min bei 1000 × g zentrifugiert. Während dieser Zeit wurden 5 ml RPMI 1640 in 15 ml beziehungsweise in 50 ml Falcon Zentrifugenröhrchen (die Größe der Zentrifugenröhrchen ist abhängig von der Menge an Vollblut, für über 6,5 ml Vollblut mussten die größeren Röhrchen verwendet werden) vorgelegt und Eppendorf Tubes (1,5 ml) entsprechend der gewollten Verdünnung mit Türks Lösung befüllt. Nach Ablauf der Zentrifugation befanden sich die roten Blutkörperchen unterhalb des Filters, während oberhalb des Filters Blutplasma, Blutserum und ein sichtbarer Ring aus Lymphozyten waren. Der Überstand oberhalb des Filters wurde mit einer Transferpipette vorsichtig abgesaugt und in das vorbereitete Medium gegeben. Anschließend wurde für 10 min bei 250 × g und 5 °C zentrifugiert. Nach Ablauf der Zeit war am konischen Ende des Falcon-Tubes ein Zellpellet sichtbar.

Der Überstand oberhalb des Zellpellets wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. 0,5 ml PBS und 0,5 ml 4 %iges pFA wurden zu den Zellen hinzugegeben. Nach gründlichem und vorsichtigem Mischen wurde das Falcon-Tube für 15 min bei 5 °C in der Zentrifuge zur Fixierung ohne Rotation gekühlt. Anschließend wurde erneut für 10 min bei 250 × g und 5 °C zentrifugiert.

Nach Ablauf der Zentrifugation war erneut ein Zellpellet sichtbar. Der Überstand wurde wieder abdekantiert, das Pellet in 2-10 ml PBS (je nach Menge des Blutvolumens siehe Tabelle 9) aufgenommen und vorsichtig vermischt. Entsprechend der Verdünnung mit Türks Lösung wurde die Menge an Zellsuspension entnommen, in das Eppendorf Tube mit der Türks Lösung gefüllt und gut vermischt. In der Versuchsreihe wurde entweder eine 1 : 3 oder eine 1 : 4 Verdünnung mit Türks Lösung verwendet. Durch die Türks Lösung wurden die Lymphozyten angefärbt und konnten gezählt werden.

Tabelle 9: Anleitungsrößen zur Verdünnung der Lymphozyten.

Volumen Vollblut (ml)	3	6	8	10	20
Erwartete Anzahl Lymphozyten in Millionen	3	6	8	10	20
Verdünnung Pellet in PBS (ml)	2	2	4	4	4
Verdünnung Türks	1 : 2	1 : 4	1 : 3	1 : 3	1 : 7
Menge Zellsuspension (µl)	10	10	10	10	10
Menge Türks (µl)	10	30	20	20	60

Eine Neubauer-Zählkammer wurde mit der Suspension befüllt und die Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Entsprechend der Formel "Durchschnitt gezählter Zellen × 10.000 (Kammerfaktor) × Verdünnung Türks Lösung × Verdünnung PBS" konnte die Zellzahl in der vorliegenden Lösungsmenge errechnet werden. Es wurde eine Zellzahl von circa einer Million Lymphozyten pro Milliliter erwartet. Die Lösung wurde mit der entsprechenden Menge an PBS verdünnt, sofern mehr als eine Million Lymphozyten pro Milliliter errechnet wurden. Wurde die Million Lymphozyten pro Milliliter nicht erreicht, so

wurde erneut bei $250 \times g$ für 10 min zur Aufkonzentrierung der Zellen zentrifugiert und die entsprechende Menge des Überstands entnommen.

3.6. Durchführung des γ -H2AX-Assays

3.6.1. Reagenzien

Tabelle 10: Verwendete Reagenzien zur Durchführung des γ -H2AX-Assays.

Produkt	Firma
Triton™ X-100 Peroxid- und Carbonyl-frei	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycin für Elektrophorese	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vectashield® Mounting Medium (Anti Fading)	LINARIS Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland
bisBenzimide H 33342 trihydrochloride (Hoechst 33342)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Deutschland
Anti-Phospho-Histone H2A.x (Ser139) 20E3 Rabbit monoclonal primary antibody	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt a. M. Germany
Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab') ₂ Fragment (Alexa Fluor® 555 Conjugate)	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt a. M. Germany

3.6.2. Reagenzienvorbereitung

Zu Beginn wurden 750 μ l Triton in 500 ml PBS gelöst und für ungefähr 45 min bei Raumtemperatur (RT) gerührt. Ebenfalls wurden 1 g BSA und 0,15 g Glycin in 100 ml PBS gelöst. Der primäre Antikörper (AK) wurde mit PBS/BSA verdünnt (1 : 200) und kurz gevortext. Der sekundäre AK wurde im abgedunkelten Raum mit PBS/BSA verdünnt (1 : 1000) und ebenfalls kurz gevortext. Zur Herstellung des Hoechst-Farbstoffes wurden zwei bis drei Körnchen Hoechst 33342 in 60 ml PBS gelöst und 1 : 1 mit PBS verdünnt.

3.6.3. Durchführung

Die Objektträger wurden jeweils mit einem Filteraufsatz in Metallgestelle gespannt. In jeden Filteraufsatz wurden 100 μ l Zellsuspension getropft und für 5 min bei 700 rpm (rounds per minute) zentrifugiert. Danach wurden die Filter und Gestelle von den Objektträgern entfernt und diese in Glasküvetten mit

PBS gesammelt. Anschließend folgten drei Waschschrirte à 5 min mit PBS/Triton in jeweils frischen, vollen Glasküvetten. Danach wurden die Objektträger dreimal für 10 min in PBS/BSA (Blockierungs-lösung) in frischen Glasküvetten geblockt. Während den letzten 10 min wurde die AK-Stocklösung vor-sichtig resuspendiert. Auf jeden Objektträger wurden 75 µl des verdünnten AK pipettiert und mit einem Deckglas über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Dunkelbox inkubiert.

Am zweiten Tag des Assays wurden zu Beginn vorsichtig alle Deckgläser von den Objektträgern ent-fernt und diese wieder in PBS gesammelt. Anschließend wurden die Objektträger in vollen Glasküvetten erst 5 min in PBS, dann 10 min in PBS/Triton und 5 min in frischem PBS gewaschen. Die Objektträger wurden anschließend für 7 min mit PBS/BSA geblockt.

Alle weiteren Schritte mussten unter Abdunkelung des Raumes durchgeführt werden. Pro Objektträger wurden 75 µl des sekundären AK pipettiert und 45 min in einer feuchten Dunkelbox inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Deckgläser wieder entfernt. Es folgten diverse Waschschrirte in vollen Glasküvetten: Zweimal 5 min in PBS/Triton, einmal 10 min in PBS und einmal 7 min in PBS. Im Anschluss fand die Färbung für 2 min in mit Hoechstfarbstoff gefüllten Glasküvetten statt. Nach der Färbung wurden die Objektträger erneut zweimal in Glasküvetten für jeweils 2 min in PBS gewaschen. Zum Schluss wurden 16 µl Vectashield pro Objektträger auf pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt.

3.7. Erhebung der Foci

Die Objektträger des γ -H2AX-Assay wurden in die Rahmen der automatische Bildaufnahme- und Analyseplattform Metafer eingespannt und die Messung am Computer gestartet. Zu Beginn wurden noch 10 Objektträger à 2000 Zellen ausgezählt. Um im späteren Verlauf mehrere Versuche gleichzeitig in der Analyseplattform auswerten zu können, wurden nur noch 5 Objektträger à 5000 Zellen ausgezählt. In der Umstellungsphase wurden die Assays der Probanden 537 (SA1) und 445 (SA3) mit nur 5 Objektträgern und 2000 angestrebten Zellen ausgewertet. Ergänzende Tabelle 2 zeigt die je Proband erstellte Anzahl an Objektträgern pro Untersuchungszeitpunkt und die darauf angestrebte Zellzahl.

Die Analyseplattform Metafer wurde auf folgende Parameter eingestellt:

- Vergrößerung des Mikroskops: 40x
- Filter:
 - Zellkerne: DAPI-Filter
 - Foci: Spectrum-Orange-Filter
- Fixierte Integrationszeit: 0,12 s
- Zellselektion
 - Minimale Objektgröße: 20.00 μm^2
 - Maximale Objektgröße: 200.00 μm^2
 - Maximales Seitenverhältnis: 1.4
- Intensität der Foci
 - Intensität: 70%
 - Intensitätsbereich: 0,25 – 1

3.8. Statistische Auswertung

Da sehr hohe Anzahlen von Foci bei niedrigen Strahlendosen sehr unwahrscheinlich sind und vermutlich durch technische Artefakte während der automatischen Auswertung der γ -H2AX-Foci-Daten verursacht werden, wurden alle Zellen mit mehr als fünf Foci von der Analyse ausgeschlossen. Für jeden Objektträger k wurde die prozentuale Anzahl p_k an Zellen, welche mindestens einen Focus aufwiesen, berechnet und für die weiteren Analysen verwendet. Objektträger mit niedriger Zellzahl wurden von der Datenanalyse ausgeschlossen. Dies gilt für:

- Alle Objektträger mit < 1000 Zellen, falls für den Versuch eine Zellzahl < 3000 Zellen angestrebt wurde,
- Objektträger mit < 2500 Zellen, falls für den Versuch eine Zellzahl > 3000 Zellen angestrebt wurde.

Für jede Versuchsbedingung (das heißt für Objektträger vom gleichen Studienarm, Blutentnahme und Inkubationszeit) wurde die mittlere prozentuale Anzahl an Foci $\bar{p} = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N p_k$ über alle N Replikate berechnet. Für Vergleiche bei der letzten Blutentnahme (BE3) wurde für die jeweilige Inkubationszeit ($t = 0$ min und $t = 60$ min) die Differenz zum Basalniveau $\delta = \bar{p}(BE3_t) - \bar{p}(BE1_t)$ gebildet. P -Werte $< 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

3.8.1. Hypothesen

1. Hatte die unterschiedliche Inkubationszeit einen Einfluss auf die Ergebnisse?
2. Hatte die Akquisition des Topogramms in SA1 oder des MRT-Bilddatensatzes für die Transmissionskorrektur in SA2 einen Einfluss?
3. Nach welcher Inkubationszeit trat der größte Expositionseffekt auf?
4. Hatte die Exposition mit FDG, FDG + B₀ oder B₀ einen Effekt auf die Anzahl an Strahlenschäden?
5. Gab es einen synergistischen Effekt der kombinierten Exposition von FDG + B₀ gegenüber einer Exposition mit FDG oder B₀ allein?

3.8.2. Fragestellungen

Fragestellung 1: Um den Einfluss der Inkubationszeit auf die Ergebnisse zu bestimmen, wurde die mittlere prozentuale Anzahl \bar{p} zwischen BE1₆₀ und BE1₀ mittels dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben verglichen (Nullhypothese $H_0: \bar{p}(BE1_{60}) = \bar{p}(BE1_0)$).

Fragestellung 2: Zur Testung, ob die Akquisition des Topogramms in SA1 oder des MRT-Bilddatensatzes für die Transmissionskorrektur in SA2 einen Einfluss hat, wurde die mittlere prozentuale Anzahl \bar{p} zwischen BE2₆₀ und BE1₆₀ mittels dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben verglichen (Nullhypothese $H_0: \bar{p}(BE2_{60}) = \bar{p}(BE1_{60})$).

Fragestellung 3: Für jeden Probanden wurde die mittlere prozentuale Anzahl an Foci für BE3 zuerst mit dem Mittelwert über alle Inkubationszeiten $t = 0, 15, 30, 45, 60$ min zentriert und dann durch die Standardabweichung normiert. Um die Inkubationszeit mit dem größten Expositionseffekt zu bestimmen, wurden anschließend die skalierten Werte für alle Inkubationszeiten mittels dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben mit BE3 zum Zeitpunkt $t = 0$ min verglichen (Nullhypothese $H_0: \bar{p}(BE3_0) = \bar{p}(BE3_x)$).

Fragestellung 4: Um zu testen, ob die Exposition mit FDG, FDG + B₀ oder B₀ einen Effekt auf die Anzahl der Strahlenschäden hat wurden für jeden Studienarm BE3₀ (SA1 und SA2) beziehungsweise BE2₀ (SA3) mit BE1₀ und BE3₆₀ (SA1 und SA2) beziehungsweise BE2₆₀ (SA3) mit BE1₆₀ verglichen. Dafür wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney Test für die zum Basalniveau normierte mittlere prozentuale Anzahl (δ) angewendet (Nullhypothesen $H_0: \delta(BE3_0) = \delta(BE1_0)$ für SA1 und SA2 beziehungsweise $H_0: \delta(BE2_0) = \delta(BE1_0)$ für SA3 und $H_0: \delta(BE3_{60}) = \delta(BE1_{60})$ für SA1 und SA2 beziehungsweise $H_0: \delta(BE2_{60}) = \delta(BE1_{60})$ für SA3).

Fragestellung 5: Um Herauszufinden, ob es einen synergistischen Effekt der kombinierten Exposition von FDG + B₀ gegenüber einer Exposition mit FDG oder B₀ allein gab wurde die zum Basalniveau normierte mittlere prozentuale Anzahl (δ) zwischen den Studienarmen mittels Kruskal-Wallis-Tests verglichen (Nullhypothese: Zwischen den Studienarmen besteht kein Unterschied). Zusätzlich wurden noch paarweise Vergleiche zwischen allen Studienarmen mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Tests durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Stichprobenbeschreibung

Die drei untersuchten Studienarme bestanden aus mindestens 10 Probanden mit einem Durchschnittsalter von $25,3 \pm 2,6$ Jahren. Für die beiden PET-Studienarme wurden im Mittel $337,7 \pm 39,7$ MBq (SA1) beziehungsweise $314,0 \pm 41,2$ MBq (SA2) appliziert.

Eine Übersicht über die Zusammensetzung der Stichproben, sowie die Anzahl an gemessenen Lymphozyten pro Studienarm geben Tabelle 11 und Tabelle 12. Die genaue Beschaffenheit der einzelnen Studienarme ist in Ergänzende Tabelle 1 einzusehen.

Tabelle 11: Stichprobenzusammensetzung der einzelnen Studienarme im Überblick.

	PET-CT (SA1)	PET-MRT (SA2)	MRT (SA3)
Probandenzahl	10	10	12
m : w	5 : 5	5 : 5	4 : 8
Alter (Jahre)	$26,0 \pm 2,9$	$24,8 \pm 2,6$	$25,1 \pm 2,1$
Größe (m)	$1,75 \pm 0,06$	$1,76 \pm 0,10$	$1,73 \pm 0,09$
Gewicht (kg)	$77,0 \pm 10,7$	$72,9 \pm 9,2$	$64,7 \pm 9,1$
BMI (kg/m²)	$25,2 \pm 3,6$	$23,7 \pm 2,4$	$21,5 \pm 2,0$
injizierte Dosis (MBq)	$337,7 \pm 39,7$	$314,0 \pm 41,2$	-

Tabelle 12: Übersicht über die Anzahl an gemessenen Lymphozyten pro Studienarm und Blutentnahme.

	PET-CT (SA1)	PET-MRT (SA2)	MRT (SA3)
BE1₀	2847 ± 1347	2609 ± 1232	2410 ± 1024
BE1₆₀	2769 ± 1320	2464 ± 1147	2438 ± 1070
BE2₀	-	-	2444 ± 1056
BE2₁₅	-	-	2432 ± 1062
BE2₃₀	-	-	2408 ± 1035
BE2₄₅	-	-	2462 ± 1106
BE2₆₀	2863 ± 1417	2525 ± 1182	2398 ± 1067
BE3₀	2770 ± 1320	2441 ± 1078	-
BE3₁₅	2843 ± 1353	2564 ± 1183	-
BE3₃₀	2833 ± 1375	2514 ± 1136	-
BE3₄₅	2645 ± 1176	2511 ± 1221	-
BE3₆₀	2630 ± 1247	2642 ± 1276	-

4.2. Einfluss der Inkubationszeit auf die Ergebnisse

Zur Ermittlung eines eventuellen Einflusses der *in vitro*-Inkubation auf die Bildung von Doppelstrangbrüchen wurden in allen Studienarmen die Blutentnahmen vor Beginn der Untersuchung, welche entweder sofort nach der Abnahme bei 5 °C gekühlt (BE1₀) oder für 60 min bei 37 °C inkubiert wurden (BE1₆₀), innerhalb der Studienarme gegenüber gestellt. Hierfür wurde die mittlere prozentuale Anzahl \bar{p} zwischen BE1₆₀ und BE1₀ mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für gepaarte Stichproben verglichen. Die Studienarme sind in Abbildung 1 farblich unterschiedlich markiert. Jeder Punkt stellt die pro Probanden durchschnittliche Anzahl an gemessenen Foci dar. Für die gepoolten Daten der drei Studienarme war ein signifikanter Abfall der Anzahl an Foci zu beobachten ($P = 0,019$).

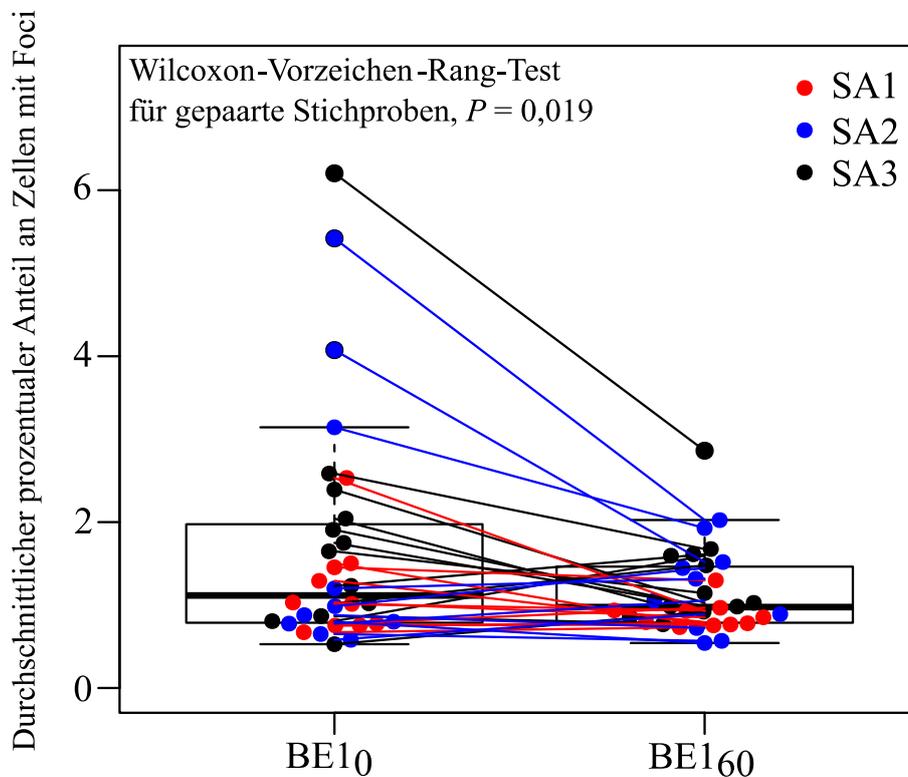


Abbildung 1: Vergleich der Anzahl an Foci (prozentual) anhand des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für gepaarte Stichproben zwischen BE1₀ und BE1₆₀, um einen Einfluss der Inkubationszeit auf die Ergebnisse festzustellen. Ein signifikanter Abfall der prozentualen Anzahl an Foci war für die gepoolten Daten der drei Studienarme zu beobachten ($P = 0,019$).

4.3. Einfluss des Topogramms in SA1 oder des MRT-Bilddatensatzes für die Transmissionskorrektur in SA2

Zur Ermittlung eines Einflusses des Topogramms in SA1 oder des MRT-Bilddatensatzes für die Transmissionskorrektur in SA2 wurde die mittlere prozentuale Anzahl \bar{p} zwischen BE_{260} und BE_{160} des jeweiligen Studienarmes mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben verglichen. Wie in Abbildung 2 zu erkennen ist, hatte weder das Topogramm (SA1; $P = 0,49$), noch die Schwächungskorrektur (SA2; $P = 0,19$) einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl an Foci vor oder nach der jeweiligen Teiluntersuchung.

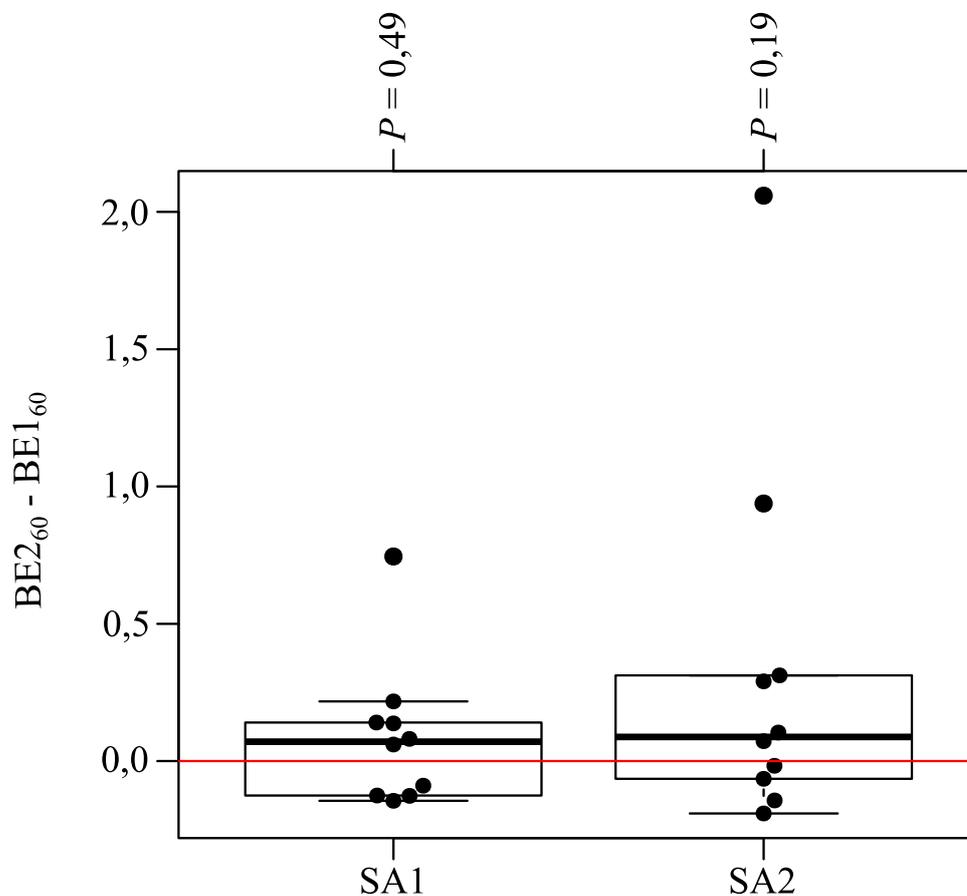


Abbildung 2: Differenzen der prozentualen Anzahl an Zellen mit Foci zwischen BE_{260} und BE_{160} , jeweils für SA1 beziehungsweise SA2. Die P -Werte beruhen auf Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests der Differenzen $\bar{p}(BE_{260}) - \bar{p}(BE_{160})$. Es war kein signifikanter Einfluss auf die Anzahl an Foci vor oder nach der Teiluntersuchung darstellbar.

4.4. Feststellung des Inkubationszeitpunktes mit dem größten Expositionseffekt

Um zu testen, bei welchem Inkubationszeitpunkt der größte Expositionseffekt auftritt, wurde in allen drei Studienarmen die letzte Blutentnahme in fünf Einzeldosen aufgeteilt und die Anzahl der dort gemessenen Foci miteinander verglichen.

Hierfür wurde für jeden Proband die mittlere prozentuale Anzahl an Foci für BE3 (SA1 und SA2) beziehungsweise BE2 (SA3) zuerst mit dem Mittelwert über alle Inkubationszeiten ($t = 0, 15, 30, 45, 60$ min) zentriert und anschließend durch die Standardabweichung normiert. Zur Bestimmung der Inkubationszeit mit dem größten Expositionseffekt wurden danach die skalierten Werte für alle Inkubationszeiten mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben mit BE3 beziehungsweise BE2 zum Zeitpunkt $t = 0$ min verglichen (Nullhypothese $H_0: \bar{p}(BE3_0) = \bar{p}(BE3_x)$).

In den Grafiken in Abbildung 3 ist jede Farbe einem Proband des jeweiligen Studienarms zugeordnet und über die Verbindung der einzelnen Messpunkte ist für jeden Probanden der zeitliche Verlauf ersichtlich. Es war ein leichter Trend eines Abfalls der Anzahl an Foci in allen drei Studienarmen zu erkennen. Außer in BE3₁₅ des SA1 ($P = 0,049$) und in BE3₄₅ in SA1 & SA2 ($P = 0,0083$) waren die Ergebnisse nicht signifikant. Des Weiteren waren starke inter- und intraindividuelle Schwankungen zwischen den Ergebnissen der Probanden auffällig.

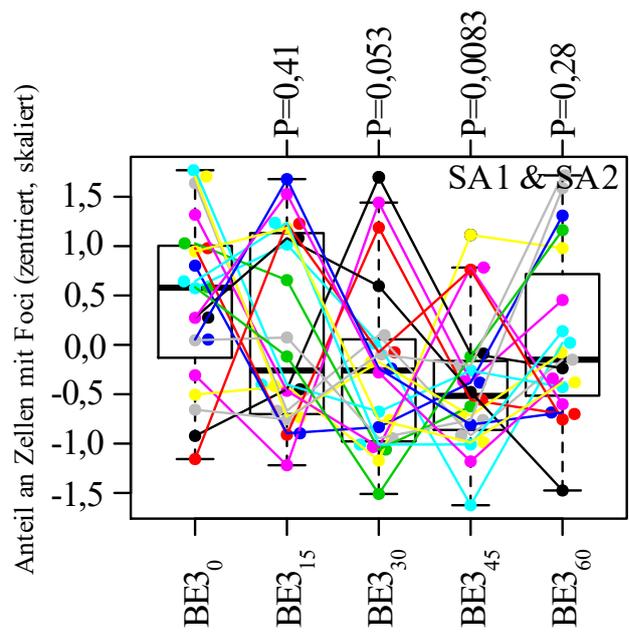
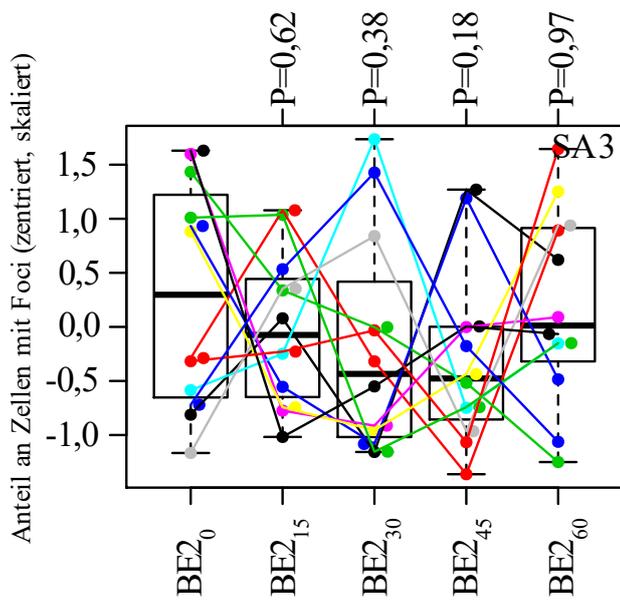
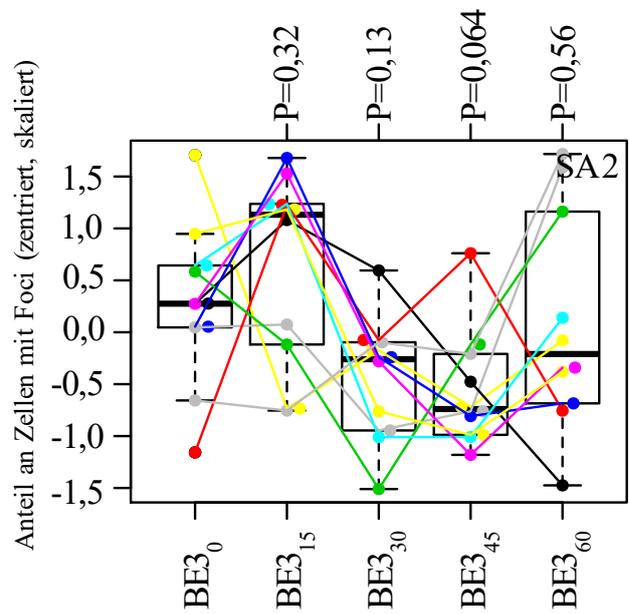
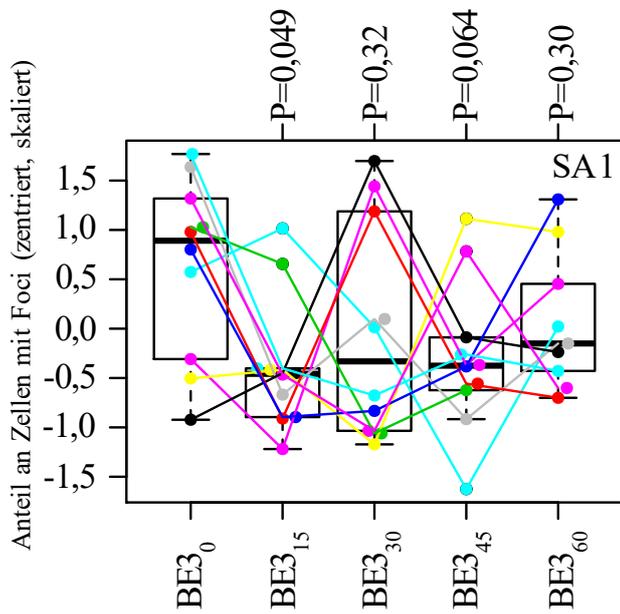


Abbildung 3: Anteil an Zellen mit Foci (zentriert und skaliert) der dritten Blutentnahme in SA1 und SA2 beziehungsweise der zweiten Blutentnahme in SA3 zu den Inkubationszeitpunkten $t = 0, 15, 30, 45$ und 60 min. Es zeichnete sich ein leichter, nicht signifikanter Abfall an aufgetretenen Foci ab. Jede Farbe wurde einem Probanden des jeweiligen Studienarms zugeordnet, der zeitliche Verlauf ist durch die Verbindungslinien dargestellt. Es waren starke inter- und intraindividuelle Schwankungen erkennbar.

4.5. Effekt der Exposition mit [¹⁸F]FDG, [¹⁸F]FDG + B₀ oder B₀ auf die Anzahl an Strahlenschäden

Zur Ermittlung eines möglichen Effekts auf die Anzahl an Strahlenschäden durch die Exposition des radioaktiven Tracers (SA1), des radioaktivem Tracer gepaart mit einem Magnetfeld (SA2) oder des Magnetfelds alleine (SA3), wurden für jeden Studienarm die Vergleiche BE₃₀ versus BE₁₀ (SA1 und SA2) beziehungsweise BE₂₀ versus BE₁₀ (SA3) und BE₃₆₀ versus BE₁₆₀ (SA1 und SA2) beziehungsweise BE₂₆₀ versus BE₁₆₀ (SA3) durchgeführt. Die Testung erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Tests für die zum Basalniveau normierte mittlere prozentuale Anzahl (δ) (Nullhypothesen $H_0: \delta(BE_{30}) = \delta(BE_{10})$ für SA1 und SA2 beziehungsweise $H_0: \delta(BE_{20}) = \delta(BE_{10})$ für SA3 und $H_0: \delta(BE_{360}) = \delta(BE_{160})$ für SA1 und SA2 beziehungsweise $H_0: \delta(BE_{260}) = \delta(BE_{160})$ für SA3). Im Vergleich BE₃₀ versus BE₁₀ beziehungsweise BE₂₀ versus BE₁₀ war in SA1 (Exposition mit [¹⁸F]FDG) ein signifikanter Anstieg an Doppelstrangbrüchen ($P = 0,037$) ersichtlich. In SA2 ([¹⁸F]FDG + B₀) zeichnete sich ebenfalls ein Anstieg der Anzahl an Foci nach der Exposition ab, allerdings war dieser nicht signifikant ($P = 0,43$). In SA3 war nach der Exposition mit dem Magnetfeld ein signifikanter Abfall an Foci beobachtbar ($P = 0,012$). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 4a dargestellt. In Abbildung 4b ist der Vergleich BE₁₆₀ versus BE₃₆₀ (SA1 und SA2) beziehungsweise BE₁₆₀ versus BE₂₆₀ (SA3) einzusehen. In SA1 und SA2 war nach der Exposition mit [¹⁸F]FDG beziehungsweise [¹⁸F]FDG + B₀ und 60 min Inkubationszeit ein signifikanter Anstieg der Anzahl an Foci aufgetreten ($P = 0,0078$ und $P = 0,014$). Bei den Probanden, welche nur dem B₀-Feld ausgesetzt waren (SA3) zeigten sich keine Veränderung der Anzahl an Foci. Dieses Ergebnis war nicht signifikant ($P = 0,47$).

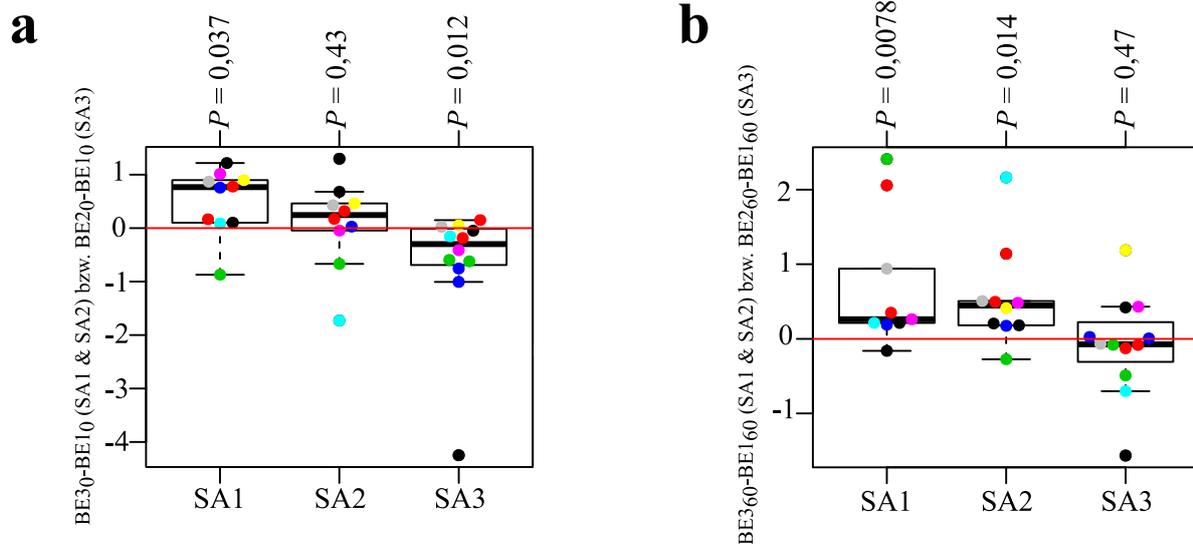


Abbildung 4: **(a)** Vergleich von BE₃₀ versus BE₁₀ (SA1 und SA2) beziehungsweise BE₂₀ versus BE₁₀ (SA3) mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Tests für die zum Basalniveau normierte mittlere prozentuale Anzahl (δ). Ein signifikanter Anstieg der Anzahl an Foci in SA1 ($P = 0,037$) und ein nicht signifikanter Anstieg der Anzahl an Foci in SA2 ($P = 0,43$) war zu beobachten. Es konnte außerdem ein signifikanter Abfall der Anzahl an Foci nach der Liegezeit der Probanden im B₀-Feld (SA3, $P = 0,012$) dargestellt werden. **(b)** Vergleich von BE₃₆₀ versus BE₁₆₀ (SA1 und SA2) beziehungsweise BE₂₆₀ versus BE₁₆₀ (SA3) mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Tests für die zum Basalniveau normierte mittlere prozentuale Anzahl (δ). Es war ein signifikanter Anstieg der Anzahl an Foci in SA1 ($P = 0,0078$) und ein signifikanter Anstieg der Anzahl an Foci in SA2 ($P = 0,014$) auffällig. Die Anzahl der Foci veränderte sich nicht signifikant durch die Platzierung der Probanden in einem B₀-Feld (SA3, $P = 0,47$).

4.6. Auftreten eines synergistischen Effekts durch die kombinierte Exposition von FDG + B₀ gegenüber einer Exposition mit FDG oder B₀ allein

Um zu testen, ob es einen synergistischen Effekt durch die gemeinsame Exposition von [¹⁸F]FDG und dem Magnetfeld gegenüber einer alleinigen Exposition der ionisierenden Strahlung oder des Magnetfeldes gibt, wurde die zum Basalniveau normierte mittlere prozentuale Anzahl gebildeter Foci (δ) zwischen den Studienarmen durch Kruskal-Wallis-Testung verglichen (Nullhypothese: Zwischen den Studienarmen besteht kein Unterschied). Bei P -Werten $< 0,05$ kann die Nullhypothese, dass es keinen Unterschied zwischen den Gruppen gibt, abgelehnt werden. Bei P -Werten von $P = 0,0029$ für die Blutentnahmen ohne Inkubation und $P = 0,034$ für die Blutentnahmen nach 60 min Inkubation konnten für beide Untersuchungen die Nullhypothese abgelehnt werden. Es gab zu beiden Zeitpunkten einen Unterschied zwischen den Studienarmen. Die Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests sind in Abbildung 5 dargestellt.

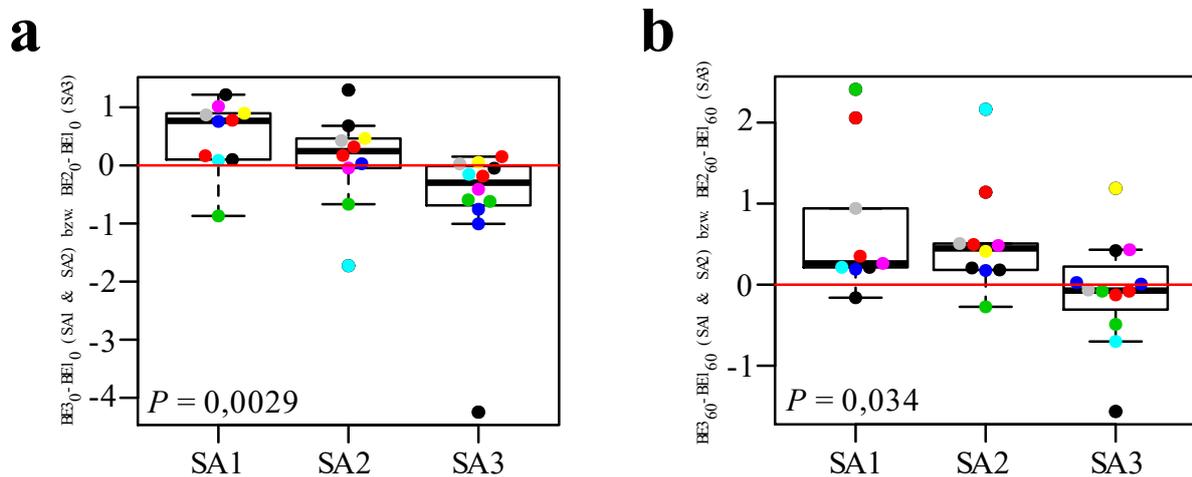


Abbildung 5: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Testung mit der Nullhypothese, dass es zwischen den einzelnen Studienarmen keinen Unterschied gab. (a) Ohne Inkubation (0 min) konnte bei einem signifikanten P -Wert ($P = 0,0029$) die Nullhypothese abgelehnt werden. Dies bedeutet, dass es zwischen den einzelnen Studienarmen einen Unterschied gab. (b) Nach 60 min Inkubation konnte bei einem P -Wert von $P = 0,034$ die Nullhypothese ebenfalls abgelehnt werden. Auch nach 60 min Inkubation gab es einen Unterschied zwischen den Studienarmen vor und nach Durchführung der Untersuchungen.

Um genauer zu differenzieren, welche Gruppen sich voneinander unterschieden, wurden paarweise Vergleiche zwischen allen Studienarmen mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Tests durchgeführt.

Hierdurch war ein signifikanter Unterschied des SA1 (PET-CT) gegenüber dem SA3 (MRT) nach 0 min Inkubation ($P = 0,001$), sowie nach 60 min Inkubation ($P = 0,04$) zu erkennen. Ebenfalls unterscheiden sich SA2 (PET-MRT) und SA3 (MRT) sowohl nach 0 min Inkubation ($P = 0,021$) als auch nach 60 min Inkubation ($P = 0,002$) signifikant voneinander. SA1 (PET-CT) und SA2 (PET-MRT) ließen sich nach

beiden Inkubationszeitpunkten nicht signifikant voneinander unterscheiden (0 min: $P = 0,22$; 60 min: $P = 0,9$). Diese Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Paarweise Vergleiche zwischen allen Studienarmen mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Testung. In der Tabelle sind die P -Werte der der Berechnung aufgetragen. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen SA1 und SA3 nach 0 min Inkubation ($P = 0,001$) und nach 60 min Inkubation ($P = 0,04$). Ebenfalls war ein signifikanter Unterschied zwischen SA2 und SA3 nach 0 min Inkubation ($P = 0,021$) und 60 min Inkubation ($P = 0,002$) zu erkennen. Kein Unterschied war zu beiden Zeitpunkten zwischen SA1 und SA2 beobachtbar (nach 0 min Inkubation $P = 0,22$; nach 60 min Inkubation $P = 0,9$).

	SA1 versus SA2 (P-Wert)	SA1 versus SA3 (P-Wert)	SA2 versus SA3 (P-Wert)
0 min Inkubation	0,22	0,001	0,021
60 min Inkubation	0,90	0,04	0,002

5. Diskussion

5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In den Untersuchungen konnte bei der ersten Blutentnahme ein signifikanter Abfall der Anzahl an Foci nach 60 min Inkubationszeit im Vergleich zu 0 min Inkubation nachgewiesen werden ($P = 0,019$).

Weder das anschließend in SA1 durchgeführte Topogramm ($P = 0,49$), noch die in SA2 folgende Schwächungskorrektur ($P = 0,19$) führten zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl an Foci.

Die Fragestellung zur Bestimmung des Inkubationszeitpunktes mit dem größten Expositionseffekt konnte aufgrund starker inter- und intraindividuelle Schwankungen nicht eindeutig beantwortet werden. Es war ein Trend mit dezentem Abfall der Anzahl an Foci in allen drei Studienarmen über die Inkubationszeit zu erkennen. Die Nullhypothese $H_0: \bar{p}(BE3_0) = \bar{p}(BE3_x)$ konnte nur für BE3₁₅ des SA1 ($P = 0,049$) und für BE3₄₅ des SA1 & SA2 ($P = 0,0083$) abgelehnt werden.

Des Weiteren wurde der Effekt des radioaktiven Tracers [¹⁸F]FDG auf die Anzahl der Foci untersucht. Bei 0 min Inkubationszeit konnte in SA1 ein signifikanter Anstieg der Anzahl an Foci nach der Gabe des Tracers nachgewiesen werden ($P = 0,037$). In SA2 war ebenfalls ein Anstieg der Foci feststellbar, dieses Ergebnis war allerdings nicht signifikant ($P = 0,43$). Nach 60 min Inkubationszeit war in beiden Studienarmen ein signifikanter Anstieg an Foci ersichtlich (SA1: $P = 0,0078$; SA2: $P = 0,014$). Ebenfalls wurde mit den durchgeführten Berechnungen der Effekt des Magnetfelds auf die Anzahl an Foci in SA3 untersucht. Nach 0 min Inkubation zeigte sich hier ein signifikanter Abfall an Foci ($P = 0,012$). Bei einer Inkubationszeit von 60 min kam es zu keiner Veränderung der Anzahl an Foci ($P = 0,47$).

Abschließend wurden noch synergistische Effekte durch die kombinierte Exposition von [¹⁸F]FDG + B₀ (SA2) gegenüber einer Exposition mit [¹⁸F]FDG (SA1) oder B₀ (SA3) allein untersucht. Hierfür wurden die Studienarme zuerst mittels Kruskal-Wallis-Test auf Unterschiede geprüft. Dies ergab, dass sowohl bei 0 min Inkubation ($P = 0,0029$), als auch bei 60 min Inkubation ($P = 0,034$) Unterschiede zwischen den Studienarmen vorhanden sind. Mithilfe der Wilcoxon-Mann-Whitney-Testung wurden paarweise die Studienarme verglichen, um differenzieren zu können zwischen welchen Armen die mittels Kruskal-Wallis-Testung festgestellten Unterschiede vorlagen. Es konnte ein Unterschied zwischen SA1 *versus* SA3 bei 0 min Inkubation ($P = 0,001$) und bei 60 min Inkubation ($P = 0,04$), sowie ein Unterschied zwischen SA2 *versus* SA3 bei 0 min Inkubation ($P = 0,021$) und bei 60 min Inkubation ($P = 0,002$) festgestellt werden.

Somit konnte die Nullhypothese der Arbeit, dass es synergistische Effekte zwischen [¹⁸F]FDG + B₀ gab, abgelehnt werden, da kein Unterschied zwischen SA1 und SA2 durch die Wilcoxon-Mann-Whitney-Testung festgestellt werden konnte (SA1 *versus* SA2 bei 0 min Inkubation ($P = 0,22$) und bei 60 min Inkubation ($P = 0,90$)). Im Gegensatz dazu konnten Unterschiede zwischen den Studienarmen mit FDG-Injektion (SA1, SA2) gegenüber SA3 identifiziert werden.

5.2. Diskussion der Methoden

5.2.1. Die Stichprobenzusammensetzung

Pro Studienarm wurden zehn (SA1, SA2) beziehungsweise zwölf (SA3) Probanden untersucht, insgesamt eine sehr kleine Anzahl. Da die Studie allerdings mit jungen, gesunden Probanden durchgeführt wurde, war es ethisch wichtig, die Anzahl an Probanden so gering wie möglich zu halten.

Es wurden den Probanden selbst überlassen ihren Studienarm zu wählen, auf die Geschlechterverteilung in den einzelnen Studienarmen wurde geachtet. In den Studienarmen SA1 und SA2 gelang die Aufteilung mit jeweils fünf männlichen und fünf weiblichen Probanden. Lediglich in SA3 war die Aufteilung mit vier männlichen und acht weiblichen Probanden nicht im Gleichgewicht. Die Probanden in den einzelnen Studienarmen variierten ebenfalls in Größe, Gewicht und dem daraus berechneten BMI. In SA1 lag der mittlere BMI bei $25,2 \pm 3,6 \text{ kg/m}^2$, in SA2 bei $23,7 \pm 2,4 \text{ kg/m}^2$ und in SA3 bei $21,5 \pm 2,0 \text{ kg/m}^2$.

In SA1 und SA2 wurde die injizierte Dosismenge anhand des Gewichts mit $4,3 \text{ MBq pro kg Körpergewicht}$ und maximal 350 MBq vorbereitet. Ein besserer Ansatz wäre gewesen, die Probanden nach BMI und Geschlecht zu paaren und anschließend blind und randomisiert in die Studienarme aufzuteilen. Um intra- und interindividuelle Effekte auszugleichen, wäre eine deutlich größere Anzahl an Probanden und evaluierten Objektträgern notwendig. Dies ist nur schwer durchführbar.

In der Studie waren rauchende Probanden nicht ausgeschlossen und vier Probanden (Nummer 186 und 025 in SA1 und Nummer 776 und 634 in SA2) gaben an Nikotinzigaretten zu rauchen. *Albino et al.* zeigten 2004 in ihrer Arbeit, dass Tabakrauch zu Doppelstrangbrüchen in der DNA führen kann, welche mit dem $\gamma\text{-H2AX}$ -Assay nachgewiesen werden können. Hierfür wurden NHBE-Zellkultur-Zellen (in Bronchialepithel-Zellkultur-Medium gezüchtet) und A549 Zellkultur-Zellen verwendet und die Doppelstrangbrüche mittels Laser-Zytometrie ausgewertet (Albino et al., 2004). Da für alle Probanden unserer Studie ein Basiswert an Doppelstrangbrüchen vor der Untersuchung ermittelt wurde, sollte dieser Effekt die Ergebnisse der Studie nicht beeinflussen.

5.2.2. Der $\gamma\text{-H2AX}$ -Assay zur Beurteilung der Doppelstrangbrüche

Den Probanden wurde 60 min nach der Injektion des radioaktiven Tracers und Beendigung der jeweiligen Untersuchung Blut abgenommen und dieses für noch einmal weitere 60 min inkubiert. Bisherige Studien mit dem $\gamma\text{-H2AX}$ -Assay zeigen eine Schwankung des Maximalwerts an Doppelstrangbrüchen von 5 min bis zu 1,5 Stunden bei einer kurzzeitigen äußeren Bestrahlung (Andrievski & Wilkins, 2009; Löbrich et al., 2005; May et al., 2012). Durch die verlängerte Inkubationszeit und die Isolierung und

Fixierung der Lymphozyten in Abständen von 15 min nach Beendigung der Untersuchung wurde versucht, den Maximalwert an Doppelstrangbrüchen abbilden zu können. In unserer Studie zeigte sich ein Trend, dass der Maximalwert der Doppelstrangbrüche in SA1 und SA3 unmittelbar nach Beendigung der Untersuchung, ohne zusätzliche Inkubation (BE3₀) und in SA2 nach 15 min Inkubation im Anschluss an die Untersuchung (BE2₁₅) zu finden ist. Da alle Blutproben gleichbehandelt wurden, lässt sich diese Schwankung am ehesten mit interindividuellen Effekten erklären.

Im Gegensatz zu den Arbeiten von *Antonelli et al.*, *Fiechter et al.* oder *Piechowiak et al.*, welche im Rahmen ihrer Arbeiten die entstandenen Foci manuell auszählten, wurden diese in unserer Studie mithilfe der automatischen Bildaufnahme- und Analyseplattform Metafer (Version 3.13.1) gezählt (Antonelli et al., 2005; Fiechter et al., 2013; Piechowiak et al., 2015). Dadurch konnte eine große Anzahl an Zellen und Foci pro Proband anhand standardisierter Kriterien ermittelt werden. Ein Nachteil dieses Vorgehens ist, dass die Kriterien festgelegt werden müssen, was zu Unterschieden zwischen verschiedenen Laboren führen kann (Shi & Tashiro, 2018).

In der hier durchgeführten Studie wurden die Probanden einer effektiven Strahlendosis von 6 – 8 mSv ausgesetzt. Viele vorausgegangene Studien, wie etwa *Antonelli et al.* oder *Ding et al.* beschäftigten sich mit Dosiswerten > 1 Gy (Antonelli et al., 2005; Ding et al., 2016). Anhand der von uns durchgeführten Studie konnte somit Untersuchungen von *May et al.* bestätigt werden, dass der γ -H2AX-Assay auch in Niedrigdosis-Bereichen sensitiv ist und zur Untersuchung synergistischer Effekte zwischen [¹⁸F]FDG und einem starken Magnetfeld verwendet werden kann (May et al., 2012).

5.2.3. Durchführung der Probandenuntersuchungen am Klinikum rechts der Isar

Die Untersuchungen am Klinikum rechts der Isar für SA2 und SA3 wurden am selben PET-MRT-Gerät durchgeführt. Des Weiteren ermöglichte eine geringe die Entfernung zwischen dem Analyselabor und dem PET-MRT-Gerät eine schnelle Kühlung beziehungsweise Weiterverarbeitung der entnommenen Blutproben ($t < 1$ min). Der Transport der Blutproben von SA1 (PET-CT) war in 1-2 min zurücklegbar. *Rogakou et al.* wiesen 1998 nach, dass bereits eine Minute nach ionisierender Bestrahlung die halbmaximale Anzahl an phosphoryliertem H2AX vorliegt (Rogakou et al., 1998). Allen Probanden wurde zur Blutabnahme eine Venenverweilkanüle, um eine zuverlässige und einfach Blutabnahme zu mehreren Zeitpunkten zu ermöglichen. Dennoch kam es aufgrund unterschiedlicher Venenverhältnisse bei manchen Probanden zu Verzögerungen bei der Blutentnahme, vereinzelt musste mit einer Butterfly-Kanüle noch einmal eine Vene punktiert werden. Dies kann zu einer Zeitspanne der Blutentnahme von 3-7 min führen. Es besteht also die Möglichkeit, dass durch die leicht verlängerte Gehstrecke mehr Foci in SA1 dargestellt werden durch die Bildung weiterer Foci *in vitro* und, dass die Ergebnisse durch erschwerte und verzögerte Blutentnahmen falsch hoch erscheinen.

Während der Liegezeit im PET-MRT-Gerät ($t = 60$ min) war es, nicht möglich, den Probanden Blut abzunehmen, da die Probanden durch die Magnetöhre komplett umschlossen waren und ihre Bettposition nicht geändert werden konnte. Dies unterscheidet unsere Studie von *May et al.*, welche Ihrer Forschungsarbeit an einem PET-CT-Gerät durchführten (May et al., 2012). Aus diesem Grund konnte die Kinetik der Foci-Bildung in unserer Studie wie bei *May et al.* leider nicht ermittelt werden.

5.3. Diskussion der Ergebnisse und der Vergleich mit anderen Studien

Hintenlang et al. untersuchten in ihrer *in vitro*-Studie synergistische Effekte zwischen ionisierender Strahlung und einem niederfrequenten 1,4 mT Magnetfeld (Hintenlang, 1993). Sie konnten keinen linearen Zusammenhang zwischen tetraploiden Chromosomen und der Bestrahlung aus ionisierender Strahlung und dem Magnetfeld feststellen. Allerdings kamen sie zu dem Schluss, dass schwache Magnetfelder zelluläre Mechanismen bestrahlter und geschädigter Zellen beeinflussen, vorher unbeobachtete Zellprozesse in geschädigten Zellen aktivieren und somit als karzinogene Promoter wirken können.

Die Effekte eines 10 T statischen Magnetfelds auf humane, periphere Immunzellen erforschten *Onodera et al.* mit dem Ergebnis, dass kein Unterschied in der Lebensfähigkeit von nicht stimulierten Immunocyten nach drei Stunden nachzuweisen ist (Onodera et al., 2003). Nach Aktivierung der Immunzellen mit Phytohämagglutinin (PHA) war die Anzahl an lebenden, stimulierten Lymphozyten geringer als die Anzahl nichtstimulierter. Sie kamen somit zu dem Schluss, dass ein starkes statisches Magnetfeld Effekte auf Zellen, welche sich in der Zellteilungsphase befinden, haben kann. Auf Zellen, welche sich nicht in der Zellteilung befinden, hat das statische Magnetfeld nur einen geringen Einfluss.

Lee et al. beschäftigten sich mit dem genotoxischen Potentials eines 3 T MRTs auf menschliche Lymphozyten *in vitro* (Lee et al., 2011). Sie stellten fest, dass sich der DNA-Schaden in Zellen, welche in einem 3 T Magnetfeld kultiviert wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe verdoppelte und das Auftreten von chromosomalen Aberrationen in exponierten Zellen signifikant höher war.

Das schädliche Potential eines 7 T MRT auf humane Lymphozyten untersuchten *Reddig et al.* in ihrer *in vitro*-Studie und kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Untersuchung zu keiner erhöhten Zytotoxizität und keiner erhöhten Bildung von γ -H2AX-Foci führt (Reddig et al., 2015).

Auch *Schwenzer et al.* befassten sich damit den Effekt eines statischen Magnetfelds und den zweier Bildsequenzen eines 3 T MRTs *in vitro* auf die Induktion von Doppelstrangbrüchen in menschlichen Zelllinien zu erforschen (Schwenzer et al., 2007b). Dabei konnte ebenfalls eine oder 24 Stunden nach der Exposition kein Anstieg an γ -H2AX-Foci festgestellt werden.

In einer weiteren *in vitro*-Studie untersuchten *Schwenzer et al.* noch das teratogene Potential eines statischen Magnetfelds mit 3 T und konnten ebenfalls keinen Einfluss auf die klonogene Fähigkeit, die Proliferation oder den Zellzyklus menschlicher Fibroblasten feststellen (Schwenzer et al., 2007a).

Anders als bei *Hintenlang et al.* und *Onodera et al.* wurde in unserer *in vivo*-Studie ein Magnetfeld mit 3 T Stärke verwendet (Hintenlang, 1993; Onodera et al., 2003). Dabei konnten keine Zunahme der DNA-Brüche durch das verwendete Magnetfeld festgestellt werden, was mit den Ergebnissen der anderen Gruppen übereinstimmt. *Hintenlang et al.* mutmaßten, dass Magnetfelder bei geschädigten Zellen als karzinogene Promoter wirken können und *Ondera et al.* zeigten, dass in aktivierten Lymphozyten die Anzahl lebender Lymphozyten nach 3 Stunden im Magnetfeld geringer war. Weitere Studien zur

Definition des karzinogenen Potentials von Magnetfeldern sind weiterhin notwendig, um eine abschließende Bewertung zu erstellen.

Fiechter et al. erforschten den Einfluss eines Routine-Kardio-MRTs (CMR) auf die Entstehung von Doppelstrangbrüchen in Monozyten und das karzinogene Potential dieser Untersuchung (*Fiechter et al.*, 2013). Hierfür nahmen sie 20 Patienten vor und nach einer Routine Untersuchung des Herzens mit Kontrastmittel in einem 1,5 T MRT-Scan Blut ab, isolierten Monozyten und T-Lymphozyten und zählten die Doppelstrangbrüche mittels Immunfluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie. Diese Studie war die erste ihrer Art, in der *in vivo* nach Kontrastmittel-MRT ein Anstieg an Doppelstrangbrüchen in Lymphozyten festzustellen war. Es war allerdings nicht möglich, die bekannten genotoxischen Effekte des Gadolinium-basierten Kontrastmittels und dem Effekt des Magnetfelds zu unterscheiden. Aufgrund ihrer Ergebnisse fordern *Fiechter et al.*, das CMR unter Vorsicht zu nutzen und forderten zudem ähnliche Restriktionen wie bei nuklearmedizinischen oder röntgenbasierten Untersuchungen.

Auch *Lancellotti et al.* befassten sich mit durch ein 1,5 T CMR hervorgerufene Reaktionen in humanen Blutzellen bei 20 gesunden Probanden ohne Kontrastmittel (*Lancellotti et al.*, 2015). Ihre Ergebnisse lauteten, dass keine signifikanten DNA-Schäden in der Durchfluss-Zytometrie eine und zwei Stunden nach CMR nachweisbar sind. Allerdings wurde ein signifikanter Anstieg der γ -H2AX-Intensität zwei Tage und einen Monat nach CMR im Vergleich zu den Werten vor der Untersuchung beobachtet. Ein Jahr nach der Untersuchung waren in den untersuchten Lymphozyten keine bestehenden Schäden mehr nachweisbar. Sie kamen zu dem Schluss, dass ein 1,5 T CMR ohne Kontrastmittel DNA-Doppelstrangbrüche in Immunzellen innerhalb eines Monats verursachen kann und riefen daher ebenfalls zur Vorsicht auf, ein CMR innerhalb eines Monats zu wiederholen. Die Ergebnisse von *Fiechter et al.* und *Lancellotti et al.* konnten durch unsere Studie, sowie die Studien von *Onodera et al.* und *Schwenzer et al.* nicht bestätigt werden, auch wenn die hierbei verwendete Magnetfeldstärke über den genannten 1,5 T des CMR lag (*Fiechter et al.*, 2013; *Lancellotti et al.*, 2015; *Onodera et al.*, 2003; *Schwenzer et al.*, 2007a; *Schwenzer et al.*, 2007b).

Strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen nach Angiografien verschiedener Körperregionen widmeten sich *Kuefner et al.* in ihrer *in vivo*-Studie aus dem Jahr 2009 (*Kuefner et al.*, 2009). Die Angiografien wurden bei 70-90 kV und der Injektion von iodhaltigem Kontrastmittel bei 31 Patienten durchgeführt. Mithilfe des γ -H2AX-Assays, welcher in diesem Fall manuell bis zu einer Mindestanzahl an 40 Foci pro Probe ausgewertet wurde, stellten *Kuefner et al.* fest, dass die maximalen Werte an Foci 15 min nach Expositionsende auftraten. In der von uns durchgeführten Studie konnte diese Erkenntnis aufgrund starker inter- und intraindividuelle Schwankungen nicht bestätigt werden.

Mit der Fragestellung nach der Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Lymphozyten bei Patienten, welche eine PET-CT-Untersuchung mit [18 F]FDG erhielten, befassten sich *May et al.* (*May et al.*, 2012). Die 33 Patienten bekamen gewichtsadaptiert 3 MBq pro kg Körpergewicht

(223 MBq; Spannweite 138 – 354 MBq) das Radiopharmakon injiziert und die Untersuchung wurde mit 120 kV durchgeführt. Die Mittlere Verzögerung zwischen [¹⁸F]FDG-Injektion und PET-Akquisition betrug 80 ± 22 min. Es wurde den Patienten vor der Injektion des Radiopharmakons, vor der Untersuchung des CTs sowie nach Ende der vollständigen Untersuchung Blut abgenommen und anschließend die Lymphozyten isoliert. Die Quantifizierung der Doppelstrangbrüche erfolgte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und manuellem Auszählen von 40 γ -H2AX-Foci pro Probe. In der Studie wurde ein statistisch signifikanter Anstieg an Doppelstrangbrüchen in Lymphozyten durch Exposition des Radionuklids und der Röntgenstrahlung ermittelt und es konnte ein triphasisches Auftreten von Foci nach der Injektion von [¹⁸F]FDG festgestellt werden.

Anders als bei der Studie von *Kuefner et al.* trat die maximale Anzahl an Foci bei den Untersuchungen von *May et al.* 30 min nach der [¹⁸F]FDG-Injektion auf (*Kuefner et al.*, 2009; *May et al.*, 2012). Auch *Roch-Lefèvre et al.* stellten bei einer Bestrahlung mit 0,5 Gy einen raschen Anstieg an γ -H2AX-Foci mit einem Maximum nach 30 min Inkubation des Vollblutes fest (*Roch-Lefevre et al.*, 2010). Dies ist ebenfalls aufgrund der starken intra- und interindividuellen Schwankungen nicht mit unseren Ergebnissen zu vergleichen. Im Gegensatz zu *May et al.* wurde den Patienten in unserer Studie eine Dosis von 4,3 MBq pro kg Körpergewicht verabreicht (*May et al.*, 2012). Während in der oben genannten Arbeit eine Verzögerung von 80 min nach der Injektion von [¹⁸F]FDG und dem Starten der PET-Untersuchung vorlag, wurde in unserer Studie das [¹⁸F]FDG gleichzeitig mit dem Start der PET-Sequenz gestartet.

Die Blutentnahmen für die *in vivo*-Zeitverläufe [¹⁸F]FDG-induzierter-Doppelstrangbrüche und deren Reparatur fanden bei *May et al.* nicht einheitlich statt, da zwischen 4 – 11 Mal Blut zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen wurde. Den beschriebenen triphasischen Verlauf der Foci-Bildung konnten wir durch die Position der Probanden im PET-MRT-Gerät und der daraus verhinderten Blutentnahme während der Untersuchung nicht untersuchen. Außerdem ist anzumerken, dass *May et al.* die Anzahl an Foci manuell bis 40 γ -H2AX-Foci pro Probe ermittelt wurde (*May et al.*, 2012). Dies ist nicht mit der automatischen Quantifizierung zu vergleichen, welche in unserer Studie durchgeführt wurde. Da in unserer Studie pro Proband und pro Untersuchungszeitpunkt mehrere Slides mit 2000 – 5000 Zellen ausgewertet wurden (siehe Ergänzende Tabelle 2), konnten wir eine viel größere Anzahl an Foci in die Bewertung einfließen lassen. Nichtsdestotrotz müssen die Systemparameter, zum Beispiel die Einstellungen für Focus-Größe und -Intensität durch einen Mitarbeiter festgelegt werden. Dies kann zu unterschiedlichen Ergebnissen zwischen einzelnen Laboren führen (*Shi & Tashiro*, 2018).

Löbrich et al. untersuchten die Bildung sowie Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mithilfe der Auswertung von γ -H2AX Foci nach CT-Untersuchungen (*Löbrich et al.*, 2005). Die ebenfalls manuell ausgezählten Foci zeigten, dass die Bildung von γ -H2AX-Foci eine Möglichkeit ist, die Induktion von Strahlenschäden *in vivo* zu beurteilen. Da ein signifikanter Anstieg an γ -H2AX-Foci bei einem Dosislängenprodukt von 150 mGy \times cm gemessen wurde, gehen die Autoren davon aus, dass der Assay die

Induktion von Doppelstrangbrüchen und deren Reparatur *in vivo* ab einer mittleren Blutdosis von 3 mGy darstellen kann. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen *Rothkamm et al.* (Rothkamm & Löbrich, 2003). Sie stellten *in vitro* und mit manueller Auswertung einerseits fest, dass über das Messen von Foci die Bildung und Reparatur von Doppelstrangbrüchen darstellbar ist und andererseits, dass Foci bereits nach niedrigen Dosen mit 1 mGy detektiert werden können. Dadurch bestätigten sie die Sensitivität des γ -H2AX-Assay bei niedrigen Dosen. Es wurde eine lineare Beziehung für die Anzahl an γ -H2AX-Foci pro Zelle und der Dosis an ionisierender Strahlung von 1,2 mGy bis 2 mGy ermittelt. Wir konnten diese Ergebnisse bei einer berechneten Blutdosis von 2 – 3 mGy bei den Probanden unserer Studie, bestätigen. Mit der Beurteilung der Effekte eines PET-Scans mit [¹⁸F]FDG auf periphere Lymphozyten anhand Apoptose, chromosomaler Aberration und Bildung von γ -H2AX-Foci befassten sich *Schnarr et al.* in ihrer *in vivo* Studie im Jahr 2015 (Schnarr et al., 2015). Dabei fanden sie einen schwach positiven, aber nicht signifikanten, Zusammenhang zwischen der injizierten Aktivität an [¹⁸F]FDG und der Anzahl an γ -H2AX-Foci. Des Weiteren einen stärker positiven, aber nicht signifikanten, Zusammenhang zwischen der γ -H2AX-Foci-Intensität und der Anzahl der Apoptosevorgänge. Wir fanden im Vergleich einen signifikanten Anstieg der γ -H2AX-Foci nach der Injektion des radioaktiven Tracers, in SA1 nach 0 min (BE3₀) und 60 min (BE3₆₀) und in SA2 nach 60 min (BE3₆₀) Inkubation.

Ismail et al. fanden heraus, dass die Anzahl an γ -H2AX-Molekülen, welche pro Doppelstrangbruch generiert werden, zwischen einzelnen Individuen variieren (Ismail et al., 2007). Damit könnten sich die starken intra- und interindividuellen Schwankungen unserer Fragestellung zum Zeitpunkt der maximalen Anzahl an Foci erklären lassen.

5.4. Ausblick auf künftige Studien

Die Untersuchung des genotoxischen Potentials von Geräten, welche im Klinikalltag häufig genutzt werden, ist sowohl für die Patienten als auch die verordnenden Ärzte wichtig. In unserer Studie konnte ein Anstieg an Doppelstrangbrüchen durch die Verwendung des radioaktiven Tracers [¹⁸F]FDG sowie der ionisierenden Strahlung des CTs nachgewiesen werden. Wir konnten im Gegensatz zu anderen Gruppen kein genotoxisches Potential des reinen Magnetfeldes feststellen (Hintenlang, 1993; Lee et al., 2011). Des Weiteren war in unserer Studie kein Synergismus der ionisierenden Strahlung von [¹⁸F]FDG und des Magnetfeldes festzustellen.

Da in unserer Studie nur gesunde junge Probanden teilnahmen, war es ethisch wichtig, die Probandenzahl so klein wie möglich zu halten. Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen und auch die aufgetretenen intra- und interindividuellen Schwankungen der Doppelstrangbrüche, welche das Erkennen kleiner Effekte der Exposition erschweren, zu minimieren, wäre es von Nöten, die Studie mit einer größeren Probandenzahl und mehr ausgezählten Slides durchzuführen. Dies ist finanziell und vor allem ethisch nicht vertretbar.

Aufgrund der räumlichen Position der Probanden im PET-MRT-Scan war es nicht möglich, während der Untersuchung den Probanden Blut abzunehmen, um einen detaillierten Verlauf der induzierten Doppelstrangbrüche durch das [¹⁸F]FDG direkt nach der Injektion festzustellen. Ein Ansatz wäre es entweder den Probanden über einen Verlängerungsschlauch, welcher an der kubitalen Braunüle angeschlossen wird, das Blut zu entnehmen oder den Probanden die Braunüle in eine Fußvene zu legen.

Trotzdem sind die Ergebnisse unserer Studie für die strahlenhygienische Bewertung der PET-MRT-Untersuchung sehr nützlich. Bis dato wurde der Synergismus aus ionisierender Strahlung und Magnetfeld noch nicht weitgehend erforscht und es besteht noch weiterhin der Bedarf für weitere Studien.

6. Literaturverzeichnis

- Albino, A. P., Huang, X., Jorgensen, E., Yang, J., Gietl, D., Traganos, F., & Darzynkiewicz, Z. (2004). Induction of H2AX Phosphorylation in Pulmonary Cells by Tobacco Smoke - A New Assay for Carcinogens. *Cell Cycle*, 3(8), 1062-1068.
- Andrievski, A., & Wilkins, R. C. (2009). The response of gamma-H2AX in human lymphocytes and lymphocytes subsets measured in whole blood cultures. *Int J Radiat Biol*, 85(4), 369-376. doi:10.1080/09553000902781147
- Antonelli, F., Belli, M., Cuttone, G., Dini, V., Esposito, G., Simone, G., Sorrentino, E., & Tabocchini, M. A. (2005). Induction and Repair of DNA Double-Strand Breaks in Human Cells: Dephosphorylation of Histone H2AX and its Inhibition by Calyculin A. *Radiation Research*, 164(4), 514-517. doi:10.1667/rr3379.1
- Brix, G., Nekolla, E. A., Nosske, D., & Griebel, J. (2009). Risks and safety aspects related to PET/MR examinations. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 36 Suppl 1, S131-138. doi:10.1007/s00259-008-0937-4
- Bundesamt für Strahlenschutz. Grenzwerte im Strahlenschutz. Abgerufen am 30.7.2019a. <https://www.bfs.de/DE/themen/ion/strahlenschutz/grenzwerte/grenzwerte.html>
- Bundesamt für Strahlenschutz. Wie hoch ist die natürliche Strahlenbelastung in Deutschland?. Abgerufen am 31.07.2019b. http://www.bfs.de/DE/themen/ion/umwelt/natuerliche-strahlenbelastung/natuerliche-strahlenbelastung_node.html
- Bundesamt für Strahlenschutz. (2018) Röntgen: Nutzen und Risiko. Broschüre des Bundesamt für Strahlenschutz, Salzgitter.
- Bundesamt für Strahlenschutz. Röntgendiagnostik - das Verfahren. Abgerufen am 08.08.2019c. <http://www.bfs.de/DE/themen/ion/anwendung-medizin/diagnostik/roentgen/roentgen-verfahren.html>
- Buselmaier, W. (2015). *Biologie für Mediziner* (Vol. 13). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Delso, G., Ter Voert, E., & Veit-Haibach, P. (2015). How does PET/MR work? Basic physics for physicians. *Abdom Imaging*, 40(6), 1352-1357. doi:10.1007/s00261-015-0437-5
- Ding, D., Zhang, Y., Wang, J., Zhang, X., Gao, Y., Yin, L., Li, Q., Li, J., & Chen, H. (2016). Induction and inhibition of the pan-nuclear gamma-H2AX response in resting human peripheral blood lymphocytes after X-ray irradiation. *Cell Death Discov*, 2, 16011. doi:10.1038/cddiscovery.2016.11
- Ehman, E. C., Johnson, G. B., Villanueva-Meyer, J. E., Cha, S., Leynes, A. P., Larson, P. E. Z., & Hope, T. A. (2017). PET/MRI: Where might it replace PET/CT? *J Magn Reson Imaging*, 46(5), 1247-1262. doi:10.1002/jmri.25711
- Fiechter, M., Stehli, J., Fuchs, T. A., Dougoud, S., Gaemperli, O., & Kaufmann, P. A. (2013). Impact of cardiac magnetic resonance imaging on human lymphocyte DNA integrity. *Eur Heart J*, 34(30), 2340-2345. doi:10.1093/eurheartj/eh184
- Foster, E. R., & Downs, J. A. (2005). Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J*, 272(13), 3231-3240. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04741.x
- Graw, J. (2015). *Genetik* (Vol. 6). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Greve, B., Bolling, T., Amler, S., Rossler, U., Gomolka, M., Mayer, C., Popanda, O., Dreffke, K., Rickinger, A., Fritz, E., Eckardt-Schupp, F., Sauerland, C., Braselmann, H., Sauter, W., Illig, T., Riesenbeck, D., Konemann, S., Willich, N., Mortl, S., Eich, H. T., & Schmezer, P. (2012). Evaluation of different biomarkers to predict individual radiosensitivity in an inter-laboratory comparison--lessons for future studies. *PLoS One*, 7(10), e47185. doi:10.1371/journal.pone.0047185
- Hintenlang, D. E. (1993). Synergistic Effects of Ionizing Radiation and 60 Hz Magnetic Fields. *Bioelectromagnetics*, 14(6), 545-551.

- Ismail, I. H., Wadhra, T. I., & Hammarsten, O. (2007). An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans. *Nucleic Acids Res*, 35(5), e36. doi:10.1093/nar/gkl1169
- Krause, B. J., Beyer, T., Bockisch, A., Delbeke, D., Kotzerke, J., Minkov, V., Reiser, M., & Willich, N. (2007). FDG-PET/CT in der Onkologie Leitlinie. *Nuklearmedizin*, 46. doi:10.3413/nukmed-0282
- Krieger, H. (2012). *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. Wiesbaden: Springer Spektrum.
- Kuefner, M. A., Grudzenski, S., Schwab, S. A., Azoulay, S., Heckmann, M., Heinrich, M. C., Lobrich, M., & Uder, M. (2009). Strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche nach Angiografien verschiedener Körperregionen. *Rofo*, 181(4), 374-380. doi:10.1055/s-0028-1109063
- Lancellotti, P., Nchimi, A., Delierneux, C., Hego, A., Gosset, C., Gothot, A., Jean-Flory Tshibanda, L., & Oury, C. (2015). Biological Effects of Cardiac Magnetic Resonance on Human Blood Cells. *Circ Cardiovasc Imaging*, 8(9), e003697. doi:10.1161/CIRCIMAGING.115.003697
- Lee, J. W., Kim, M. S., Kim, Y. J., Choi, Y. J., Lee, Y., & Chung, H. W. (2011). Genotoxic effects of 3 T magnetic resonance imaging in cultured human lymphocytes. *Bioelectromagnetics*, 32(7), 535-542. doi:10.1002/bem.20664
- Löbrich, M., Rief, N., Kühne, M., Heckmann, M., Fleckenstein, J., Rube, C., & Uder, M. (2005). In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(25), 8984-8989. doi:10.1073/pnas.0501895102
- May, M. S., Brand, M., Wuest, W., Anders, K., Kuwert, T., Prante, O., Schmidt, D., Maschauer, S., Semelka, R. C., Uder, M., & Kuefner, M. A. (2012). Induction and repair of DNA double-strand breaks in blood lymphocytes of patients undergoing (1)(8)F-FDG PET/CT examinations. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 39(11), 1712-1719. doi:10.1007/s00259-012-2201-1
- Onodera, H., Jin, Z., Chida, S., Suzuki, Y., Tago, H., & Itoyama, Y. (2003). Effects of 10-T Static Magnetic Field on Human Peripheral Blood Immune Cells. *Radiation Research*, 159(6), 775-779. doi:10.1667/0033-7587(2003)159[0775:Eotsmf]2.0.Co;2
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., & Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*, 10(15), 886-895. doi:10.1016/s0960-9822(00)00610-2
- Piechowiak, E. I., Peter, J. F., Kleb, B., Klose, K. J., & Heverhagen, J. T. (2015). Intravenous Iodinated Contrast Agents Amplify DNA Radiation Damage at CT. *Radiology*, 275(3), 692-697. doi:10.1148/radiol.14132478
- Podhorecka, M., Skladanowski, A., & Bozko, P. (2010). H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids*, 2010. doi:10.4061/2010/920161
- Reddig, A., Fatahi, M., Friebe, B., Guttek, K., Hartig, R., Godenschweiger, F., Roggenbuck, D., Ricke, J., Reinhold, D., & Speck, O. (2015). Analysis of DNA Double-Strand Breaks and Cytotoxicity after 7 Tesla Magnetic Resonance Imaging of Isolated Human Lymphocytes. *PLoS One*, 10(7), e0132702. doi:10.1371/journal.pone.0132702
- Roch-Lefevre, S., Mandina, T., Voisin, P., Gaetan, G., Mesa, J. E., Valente, M., Bonnesoeur, P., Garcia, O., Voisin, P., & Roy, L. (2010). Quantification of gamma-H2AX foci in human lymphocytes: a method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure. *Radiat Res*, 174(2), 185-194. doi:10.1667/RR1775.1
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10).
- Rothkamm, K., & Horn, S. (2009). γ -H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann Ist Super Sanita*, 45(3), 265-271.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L. H., & Lobrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol*, 23(16), 5706-5715. doi:10.1128/mcb.23.16.5706-5715.2003

- Rothkamm, K., & Löbrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9). doi:10.1073/pnas.0830918100
- Salyga, A., Guzikowska-Ruszkowska, I., Czepczynski, R., & Ruchala, M. (2016). PET/MR - a rapidly growing technique of imaging in oncology and neurology. *Nucl Med Rev Cent East Eur*, 19(1), 37-41. doi:10.5603/NMR.2016.0007
- Schnarr, K., Carter, T. F., Gillis, D., Webber, C., Lemon, J. A., Dayes, I., Dolling, J. A., Gulenchyn, K., & Boreham, D. R. (2015). Biological Response of Positron Emission Tomography Scan Exposure and Adaptive Response in Humans. *Dose Response*, 13(4), 1559325815611904. doi:10.1177/1559325815611904
- Schulthess, G. K. v. (2016). *Röntgen, Computertomografie & Co.: Wie funktioniert medizinische Bildgebung?* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Schwenzer, N. F., Bantleon, R., Maurer, B., Kehlbach, R., Herberts, T., Claussen, C. D., & Rodegerdts, E. (2007a). In Vitro Evaluation of Magnetic Resonance Imaging at 3.0 Tesla on Clonogenic Ability, Proliferation, and Cell Cycle in Human Embryonic Lung Fibroblasts. *Investigative Radiology*, 42(4), 212-2017.
- Schwenzer, N. F., Bantleon, R., Maurer, B., Kehlbach, R., Schraml, C., Claussen, C. D., & Rodegerdts, E. (2007b). Detection of DNA double-strand breaks using gammaH2AX after MRI exposure at 3 Tesla: an in vitro study. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 26(5), 1308-1314. doi:10.1002/jmri.21138
- Shi, L., & Tashiro, S. (2018). Estimation of the effects of medical diagnostic radiation exposure based on DNA damage. *Journal of Radiation Research*, 59(suppl_2), ii121-ii129. doi:10.1093/jrr/rry006
- Standke, R. (2002). Technische Grundlagen der 18F-Fluorodeoxyglukose-Positronenemissionstomographie-Diagnostik. *Acta Medica Austriaca*, 29(5), 149-155.
- Torigian, D. A., Zaidi, H., Kwee, T. C., Saboury, B., Udupa, J. K., Cho, Z. H., & Alavi, A. (2013). PET/MR Imaging: Technical Aspects and Potential Clinical Applications. *Radiology*, 267(1), 26-44. doi:10.1148/radiol.13121038/-/DC1
- Weishaupt, D., Köchli, V. D., & Marincek, B. (2014). *Wie funktioniert MRI?* (7 ed.). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

7. Abkürzungsverzeichnis

[¹⁸ F]FDG	[¹⁸ F]Fluor-desoxyglukose
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
AC	Attenuation Correction
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
B ⁰	Magnetfeld
BE	Blutentnahme
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovine Serum Albumin
cm	Zentimeter
CMR	Kardio-MRT
CT	Computertomographie
DLP	Dosis-Längen-Produkt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e ⁻	Elektron
e ⁺	Positron
FWHM	Full Width-Half Maximum
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Gauge
Hz	Hertz
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
l	Liter
m	Meter
mA	Milliampere
mAs	Milliamperesekunden
MBq	Megabecquerel
mGy	Milligray
min	Minuten
ml	Milliliter

mm.....	Millimeter
MR.....	Magnetresonanz
MRT.....	Magnetresonanztomographie
mSv.....	Millisievert
mT.....	Millitesla
n ⁰	Neutron
ns.....	Nanosekunde
p ⁺	Proton
PBS.....	Phosphate buffered saline
PET.....	Positronen-Emissions-Tomographie
pFA.....	Paraformaldehyd
PHA.....	Phytohämagglutinin
rpm.....	rounds per minute
RPMI 1640.....	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
SA1.....	Studienarm 1
SA2.....	Studienarm 2
SA3.....	Studienarm 3
Sv.....	Sievert
T.....	Tesla

8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Vergleich der Anzahl an Foci (prozentual) anhand des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für gepaarte Stichproben zwischen $BE1_0$ und $BE1_{60}$, um einen Einfluss der Inkubationszeit auf die Ergebnisse festzustellen. Ein signifikanter Abfall der prozentualen Anzahl an Foci war für die gepoolten Daten der drei Studienarme zu beobachten ($P = 0,019$).....28
- Abbildung 2: Differenzen der prozentualen Anzahl an Zellen mit Foci zwischen $BE2_{60}$ und $BE1_{60}$, jeweils für SA1 beziehungsweise SA2. Die P-Werte beruhen auf Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests der Differenzen $\bar{p}(BE2_{60}) - \bar{p}(BE1_{60})$. Es war kein signifikanter Einfluss auf die Anzahl an Foci vor oder nach der Teiluntersuchung darstellbar.....29
- Abbildung 3: Anteil an Zellen mit Foci (zentriert und skaliert) der dritten Blutentnahme in SA1 und SA2 beziehungsweise der zweiten Blut-entnahme in SA3 zu den Inkubationszeitpunkten $t = 0, 15, 30, 45$ und 60 min. Es zeichnete sich ein leichter, nicht signifikanter Abfall an aufgetretenen Foci ab. Jede Farbe wurde einem Probanden des jeweiligen Studienarms zugeordnet, der zeitliche Verlauf ist durch die Verbindungslinien dargestellt. Es waren starke inter- und intraindividuelle Schwankungen erkennbar.31
- Abbildung 4: (a) Vergleich von $BE3_0$ versus $BE1_0$ (SA1 und SA2) beziehungsweise $BE2_0$ versus $BE1_0$ (SA3) mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Tests für die zum Basalniveau normierte mittlere prozentuale Anzahl (δ). Ein signifikanter Anstieg der Anzahl an Foci in SA1 ($P = 0,037$) und ein nicht signifikanter Anstieg der Anzahl an Foci in SA2 ($P = 0,43$) war zu beobachten. Es konnte außerdem ein signifikanter Abfall der Anzahl an Foci nach der Liegezeit der Probanden im B_0 -Feld (SA3, $P = 0,012$) dargestellt werden. (b) Vergleich von $BE3_{60}$ versus $BE1_{60}$ (SA1 und SA2) beziehungsweise $BE2_{60}$ versus $BE1_{60}$ (SA3) mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Tests für die zum Basalniveau normierte mittlere prozentuale Anzahl (δ). Es war ein signifikanter Anstieg der Anzahl an Foci in SA1 ($P = 0,0078$) und ein signifikanter Anstieg der Anzahl an Foci in SA2 ($P = 0,014$) auffällig. Die Anzahl der Foci veränderte sich nicht signifikant durch die Platzierung der Probanden in einem B_0 -Feld (SA3, $P = 0,47$).33
- Abbildung 5: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Testung mit der Nullhypothese, dass es zwischen den einzelnen Studienarmen keinen Unterschied gab. (a) Ohne Inkubation (0 min) konnte bei einem signifikanten P-Wert ($P = 0,0029$) die Nullhypothese abgelehnt werden. Dies bedeutet, dass es zwischen den einzelnen Studienarmen einen Unterschied gab. (b)

Nach 60 min Inkubation konnte bei einem P-Wert von $P = 0,034$ die Nullhypothese ebenfalls abgelehnt werden. Auch nach 60 min Inkubation gab es einen Unterschied zwischen den Studienarmen vor und nach Durchführung der Untersuchungen.34

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick der Folgen akuter Strahlenbelastung des ganzen Körpers (in Anlehnung an (Bundesamt für Strahlenschutz, 2019a)).	4
Tabelle 2: Übersicht der effektiven Dosis verschiedener medizinischer Untersuchungen (in Anlehnung an (Bundesamt für Strahlenschutz, 2018; Krause et al., 2007)).	5
Tabelle 3: Übersicht über den Studienablauf. Erklärung der Zeichen: *1 der Lymphozyten, *2 bei 37 °C im Wasserbad.	12
Tabelle 4: DLP des Topogramms vor der ersten Blutentnahme, sowie des Low-Dose-CTs im Anschluss an die dritte Blutentnahme.	13
Tabelle 5: Rekonstruierte Bilder pro Zeitabschnitt der PET-Untersuchungen.	13
Tabelle 6: Verwendete Geräte zur Durchführung der Probandenuntersuchung und der Isolierung der Lymphozyten.	17
Tabelle 7: Verwendete Geräte zur Durchführung des γ -H2AX-Assays.	18
Tabelle 8: Reagenzien zur Isolation und Fixierung von Lymphozyten aus Vollblut.	19
Tabelle 9: Anleitungsgrößen zur Verdünnung der Lymphozyten.	20
Tabelle 10: Verwendete Reagenzien zur Durchführung des γ -H2AX-Assays.	22
Tabelle 11: Stichprobenzusammensetzung der einzelnen Studienarme im Überblick.	27
Tabelle 12: Übersicht über die Anzahl an gemessenen Lymphozyten pro Studienarm und Blutentnahme.	27
Tabelle 13: Paarweise Vergleiche zwischen allen Studienarmen mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Testung. In der Tabelle sind die P-Werte der der Berechnung aufgetragen. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen SA1 und SA3 nach 0 min Inkubation (P = 0,001) und nach 60 min Inkubation (P = 0,04). Ebenfalls war ein signifikanter Unterschied zwischen SA2 und SA3 nach 0 min Inkubation (P = 0,021) und 60 min Inkubation (P = 0,002) zu erkennen. Kein Unterschied war zu beiden Zeitpunkten zwischen SA1 und SA2 beobachtbar (nach 0 min Inkubation P = 0,22; nach 60 min Inkubation P = 0,9).	35

10. Einstellungen an PET-CT und PET-MRT

10.1. PET-CT

- Topogramm
 - kV: 80
 - Tube position: Top
 - Direction: Craniocaudal
 - mA: 20
 - Topogram length: 1536 mm
 - API: None
- Low Dose CT
 - Mode: Spiral
 - kV: 120
 - Quality ref. mAS: 25
 - (Eff.) mAS: 165
 - CARE Dose type: CARE Dose4D
 - Dose modulation: on
 - Rotation time: 0,5 s
 - Collimation: 0,6 mm
 - Slice: 5 mm
 - Acq.: 128 × 0,6 mm
 - Pitch: 1,5
 - Delay: 2
 - Direction: Craniocaudal
 - Organ character: Abdomen
 - API: None
 - Scan trigger: None
 - Scan start: Start button
 - Scan time: 2,53
 - CTDIvol: 1,68
 - Phantom size: 32 cm
 - X-Care: off
 - Upper limit max. scan time: 30
 - Lower limit max. mAS: 25
 - Max. kV: 140
 - Min. kV: 80
 - CARE kV: off
 - Ref kV: 120

10.2. PET-MRT mit FDG-Injektion

- TA: 0:15 PM: ISO Voxel size: $1.7 \times 1.7 \times 6.0$ mmPAT: 2 Rel. SNR: 1.00: h
 - Routine
 - FoV read: 430 mm
 - FoV phase: 100.0 %
 - Slice thickness: 6.0 mm
 - TR: 1000.0 ms
 - TE: 84 ms
 - Averages: 1
 - Concatenations: 1
 - Contrast - Common
 - TR: 1000.0 ms
 - TE: 84 ms
 - Resolution - Common
 - FoV read: 430 mm
 - FoV phase: 100.0 %
 - Slice thickness: 6.0 mm
 - Base resolution: 256
 - Phase resolution: 70 %
 - Phase partial Fourier: 5/8
 - Resolution - iPAT
 - PAT mode: GRAPPA
 - Accel. factor PE: 2
- TA: 0:15 PM: ISO Voxel size: $1.7 \times 1.7 \times 6.0$ mmPAT: 2 Rel. SNR: 1.00: h
 - Routine
 - FoV read: 430 mm
 - FoV phase: 100.0 %
 - Slice thickness: 6.0 mm
 - TR: 1000.0 ms
 - TE: 84 ms
 - Averages: 1
 - Concatenations: 1
 - Contrast - Common
 - TR: 1000.0 ms
 - TE: 84 ms
 - Resolution - Common
 - FoV read: 430 mm

- FoV phase: 100.0 %
- Slice thickness: 6.0 mm
- Base resolution: 256
- Phase resolution: 70 %
- Phase partial Fourier: 5/8
- Resolution - iPAT
 - PAT mode: GRAPPA
 - Accel. factor PE: 2
- TA: 0:15 PM: FIX Voxel size: $1.3 \times 1.3 \times 3.0$ mmPAT: 4 Rel. SNR: 1.00: fl
 - Resolution - iPAT
 - PAT mode: CAIPIRINHA
 - Accel. Factor: PE 2

10.3. PET-MRT ohne FDG-Injektion

- TA: 0:15 PM: ISO Voxel size: $1.7 \times 1.7 \times 6.0$ mmPAT: 2 Rel. SNR: 1.00: h
 - Routine
 - FoV read: 430 mm
 - FoV phase: 100.0 %
 - Slice thickness: 6.0 mm
 - TR: 1000.0 ms
 - TE: 84 ms
 - Averages: 1
 - Concatenations: 1
 - Contrast - Common
 - TR: 1000.0 ms
 - TE: 84 ms
 - Resolution - Common
 - FoV read: 430 mm
 - FoV phase :100.0 %
 - Slice thickness: 6.0 mm
 - Base resolution: 256
 - Phase resolution: 70 %
 - Phase partial Fourier: 5/8
 - Interpolation: Off
 - Resolution - iPAT
 - PAT mode: GRAPPA
 - Accel. Factor: PE 2
- TA: 0:15 PM: ISO Voxel size: $1.7 \times 1.7 \times 6.0$ mmPAT: 2 Rel. SNR: 1.00: h
 - Routine
 - FoV read: 430 mm
 - FoV phase: 100.0 %
 - Slice thickness: 6.0 mm
 - TR: 1000.0 ms
 - TE: 84 ms
 - Averages: 1
 - Concatenations: 1
 - Contrast - Common
 - TR: 1000.0 ms
 - TE: 84 ms
 - Resolution - Common

- FoV read: 430 mm
- FoV phase: 100.0 %
- Slice thickness: 6.0 mm
- Base resolution: 256
- Phase resolution: 70 %
- Phase partial Fourier: 5/8
- Interpolation: Off
- Resolution - iPAT
 - PAT mode: GRAPPA
 - Accel. Factor: PE 2
- TA: 0:15 PM: FIX Voxel size: $1.3 \times 1.3 \times 3.0$ mmPAT: 4 Rel. SNR: 1.00: fl
 - Resolution - iPAT
 - PAT mode: CAIPIRINHA
 - Accel. factor PE: 2

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Matthias Eiber sowie meinem Mentor Herrn Prof. Gunnar Brix, die durch die Kooperation der Nuklearmedizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar und des Bundesamts für Strahlenschutz diese Doktorarbeit erst ermöglicht, mir das Thema überlassen und mir bei allen Fragen weitergeholfen haben.

Vielen Dank an die Klinikleitung der Nuklearmedizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar, bis 2018 Herr Prof. Markus Schwaiger und ab 2018 Herr Prof. Wolfgang Weber, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Untersuchungs-Slots an PET-CT- und PET-MRT-Geräten. Ebenfalls Dankeschön an Frau Silvia Schachoff und Frau Claudia Meisinger für die Durchführung der Untersuchungen und die Hilfe bei meinen Fragen zu den Geräten.

Außerdem möchte ich der AG SG 1.2 (Biologische Dosimetrie) des Bundesamtes für Strahlenschutz für die freundliche Unterstützung und das Bereitstellen der Materialien sowie des Labors danken.

Ein großes Dankeschön gilt Frau Dr. Ute Rößler, Frau Elisa Metzgen, Frau Ingrid Baumgartner und Herrn Alexander Perzlmaier. Ohne Euch würde ich wohl immer noch vor meinen Blutproben stehen, nicht wissen wie man Lymphozyten isoliert oder den γ -H2AX-Assay durchführt und die Doktorarbeit wäre noch lange nicht fertig. Außerdem hätte die Laborarbeit auch nur halb so viel Spaß gemacht.

Danke auch an Herrn Dr. David Endesfelder, der mich mit den mathematischen Auswertungen meiner Ergebnisse unterstützt und mich so durch den Wald der Zahlen geleitet hat.

Vielen Dank auch an Frau Dr. Maria Gomolka, Herrn Frank Bunk und Herrn Martin Bucher, die meine unzähligen Fragen zur Analyseplattform Metafer geduldig beantwortet haben.

Danke an Frau Alexandra Kamp für die Ausarbeitung der Dosimetrie.

Danke an Thomas, Du hast mich durch alle Phasen der Doktorarbeit begleitet und bist mir immer liebevoll mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Zu guter Letzt möchte ich auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die bedingungslose und großzügige Förderung während Schule, Studium und Promotion danken.

12. Anhang

12.1. Ergänzende Abbildungen



Probanden für Studie
**„Untersuchung synergistischer Wirkungen ionisierender
Strahlung und statischer Magnetfelder
bei PET/MR-Untersuchungen“
gesucht**

Wer? Gesunde Frauen und Männer zwischen 20 – 35 Jahren.
Wann? Im Zeitraum von 27.03.2017 bis 30.07.2017.
Was? Im Rahmen der Studie soll die synergistische Wirkung zwischen Magnetfeldern und radioaktiver Strahlung an einem sogenannten PET/MR-Kombinationsgerät untersucht werden. Hierfür werden drei Teilgruppen mit unterschiedlichen Untersuchungsparametern gebildet (PET/CT, PET/MR mit bzw. ohne Injektion von [¹⁸F]FDG) und die Ergebnisse miteinander verglichen. Die Strahlenexposition beim PET/CT liegt bei ca. 8 mSv, beim PET/MR nach Injektion von [¹⁸F]FDG bei ca. 6 mSv (zum Vergleich: die natürliche Strahlenexposition beträgt in Deutschland im Mittel 2,1 mSv).
Wie? Vor sowie nach der Untersuchung wird Blut abgenommen und untersucht.
Wie lange? Die Dauer der Teilnahme beträgt, zusätzlich zu einem Aufklärungsgespräch, einmalig ca. 2,5 Stunden.
Wo? In der Nuklearmedizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar (Ismaninger Str. 22, 81675 München).
Aufwandsentschädigung?
Je nach Studiengruppe zwischen 100 – 150€.

Ergänzende Abbildung 1: Flyer zur Anwerbung freiwilliger Probanden für die zugrundeliegende Studie.

12.2. Ergänzende Tabellen

Ergänzende Tabelle 1: Detaillierte Zusammensetzung der jeweiligen Studienarme mit zugeordneter Untersuchungsnummer, Geschlechter, Alter, injizierter Dosis (MBq), Körpergröße (m), Gewicht und daraus berechnetem Body-Mass-Index (BMI; kg/m²). In SA3 wurde kein Radiopharmakon injiziert, es gibt in diesem Studienarm keine Dosis (MBq).

	Nummer	Geschlecht	Alter (Jahre)	Dosis (MBq)	Größe (m)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m²)
SA1 (PET-CT)	237	m	24	388	1,83	88	26,28
	156	m	22	343	1,82	75	22,64
	025	m	27	287	1,76	63	20,34
	912	m	25	309	1,82	77	23,25
	319	m	26	358	1,76	75	24,21
	186	w	27	406	1,67	83	29,76
	334	w	29	360	1,76	77	24,86
	573	w	32	297	1,68	69	24,45
	518	w	26	287	1,65	63	23,14
	695	w	22	342	1,73	100	33,41
SA2 (PET-MRT)	499	m	22	330	1,83	75	22,40
	428	m	30	304	1,74	85	28,08
	673	m	25	348	1,86	80	23,12
	437	m	22	317	1,80	75	23,15
	317	m	24	407	1,94	87	23,12
	295	w	25	292	1,64	72	26,77
	544	w	27	262	1,74	59	19,49
	776	w	27	294	1,68	64	22,68
	634	w	25	259	1,65	60	22,04

	Nummer	Geschlecht	Alter (Jahre)	Dosis (MBq)	Größe (m)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m²)
	256	w	21	327	1,67	72	25,82
SA3 (MRT)	968	m	27	-	1,81	77	23,50
	083	m	25	-	1,85	69	20,16
	445	m	24	-	1,87	67	19,16
	032	m	30	-	1,8	80	24,69
	983	w	23	-	1,7	65	22,49
	318	w	23	-	1,68	58	20,55
	600	w	23	-	1,8	74	22,84
	205	w	26	-	1,7	59	20,42
	169	w	26	-	1,6	46	17,97
	607	w	23	-	1,66	58	21,05
	228	w	24	-	1,71	60	20,52
	030	w	27	-	1,62	63	24,01

Ergänzende Tabelle 2: Übersicht über die Anzahl der Objektträger und deren angestrebte Zellzahl je Proband im jeweiligen Untersuchungsarm.

Untersuchungsarm	Nummer der Untersuchung des Arms	Probandennummer	Anzahl Objektträger pro Zeitpunkt	angestrebte Zellzahl
SA1 FDG (PET-CT-Gerät)	1	237	10	2000
	2	186	10	2000
	3	156	10	2000
	4	334	10	2000
	5	912	10	2000
	6	573	5	2000
	7	319	5	5000
	9	518	5	5000
	10	025	5	5000
	SA2 FDG + B ₀ -Feld (PET-MRT-Gerät)	1	499	10
2		295	10	2000
3		428	10	2000
4		544	10	2000
5		776	10	2000
6		634	10	2000
7		673	5	5000
8		437	5	5000
9		317	5	5000
10		256	10	2000
	1	983	10	2000
	2	318	10	2000

Untersuchungsarm	Nummer der Untersuchung des Arms	Probandennummer	Anzahl Objektträger pro Zeitpunkt	angestrebte Zellzahl
SA3 B ₀ -Feld (MRT-Gerät)	3	600	10	2000
	4	205	10	2000
	5	968	10	2000
	6	169	10	2000
	7	607	10	2000
	8	083	10	2000
	9	445	5	2000
	10	228	5	5000
	11	032	5	5000
	12	030	5	5000

12.3. Einstellungen der Geräte

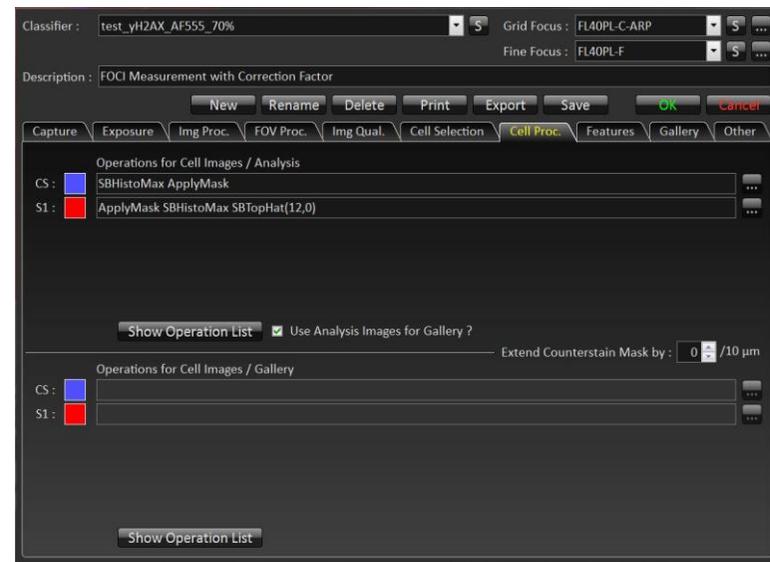
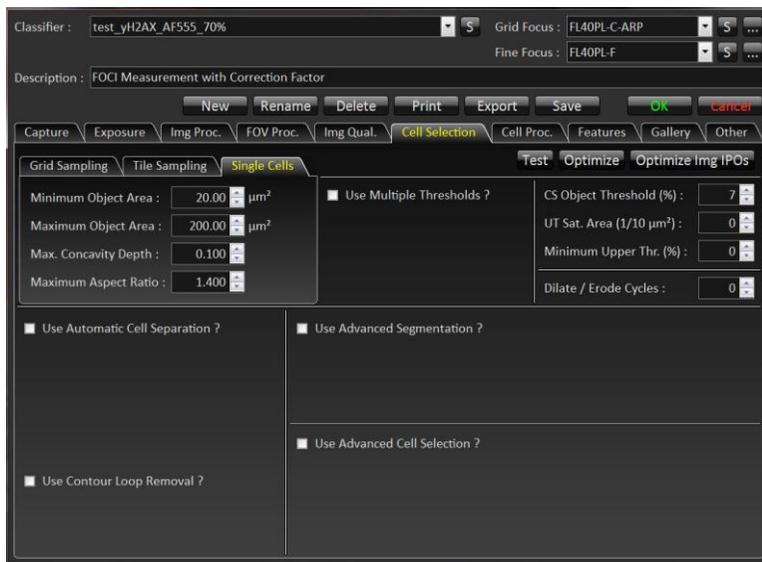
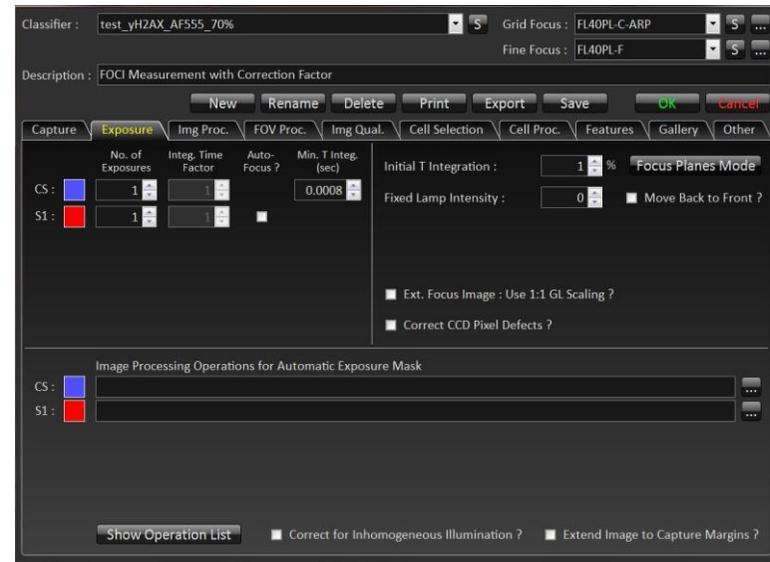
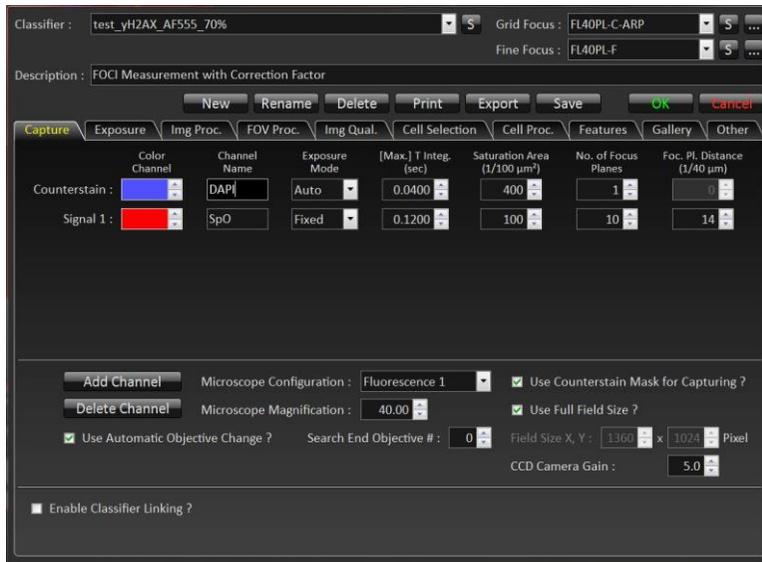
12.3.1. Einstellung zur Rekonstruktion der Bilder am PET-MRT



12.3.2. Einstellung zur Rekonstruktion der Bilder am PET-CT

Recon range (bed)	Begin	1	▼	End	1	▼	Attenuation correction CT	TK Low Dose EFOV (2-1)	▼		
Output Image type	Corrected							▼	Registration Matrices	Default	▼
Recon method	Iterative							▼			
Iterations	3	▼	Subsets	24	▼						
Image size	200	▼	Zoom	1.00	▲▼						
Filter	Gaussian	▼	FWHM (mm)	2.0	▲▼						
Offset (mm) X	0.00	▲▼	Y	0.00	▲▼						
Comments	PET FDG alt dyn										
							<input type="checkbox"/>	Scatter correction			
							<input type="checkbox"/>	Match CT slice location			
							<input type="checkbox"/>	Save mu-map image			
							<input type="checkbox"/>	Metal Artifact Reduction			
							<input checked="" type="checkbox"/>	Volume Scaling			

12.3.3. Einstellungen des Classifiers für Metafer (Version 3.13.1)



Classifier : test_yH2AX_AF555_70% S Grid Focus : FL40PL-C-ARP S ...
 Fine Focus : FL40PL-F S ...

Description : FOCI Measurement with Correction Factor

New Rename Delete Print Export Save OK Cancel

Capture Exposure Img Proc. FOV Proc. Img Qual. Cell Selection Cell Proc. Features Gallery Other

Features

CS : [Color Selection]

S1 : [Color Selection] 61(70,300,0) 73(0.25,1) 152 190["--- Object Correction by Area ---"] 129(0,1,1.5) 63 21(5,6,1) 141(0) 22(7,1)

Spot Counting : Test Optimize Optimize Img IPOs Optimize Cell IPOs Use 3D Distances ? Show Feature List

Diagram 1 : Histogram S1 2. NObj Rel. Int. Rng M (0.2) ...

Diagram 2 : ---

S1 : [Color Selection] Define Info Areas

Max. Spot Area (1/1000) : 0

Min. Spot Contrast (1/1000) : 0

Reject Cell if 0 Spots ?

Feature Groups

Size
Shape
Intensity
Distribution
Object
Object List
Object Range
Spot
Position
Derived
Comet
Comet FISH
Other

Features in Group

N of Objects
Mean Rel. Obj. Area
SDev Rel. Obj. Area
Mean Abs. Obj. Area
SDev Abs. Obj. Area
Mean Obj. Intensity
SDev Obj. Intensity
Mean Center Dist.
SDev Center Dist.
Mean Object Dist.
SDev Object Dist.
Obj. Center Moment
Total Weighted ObjAr

Channel : S1 [Color Selection]

Feature Short Name : [Text Field]

Intensity (%) : 70

Maximum Gain (%) : 300

UT: N Saturated Pixels : 0

Insert Append Delete Move Up Move Down Update Parameters

No	Group	Feature	Description
1	Object	N of Objects	Number of Objects at 70% Intensity (Maximum Gain 300%, Upper Thr. with 0 Sat. Pixels)
2	Object Range	NObj Rel. Int. Rng M	Number of Objects in Intensity Range 0.25..1 (Relative to Max. Obj. Int.)
3	Object List	Reduce Objects to Range	Reduce Object List to Objects in Range List
4	Other	Comment	--- Object Correction by Area ---
5	Object	Total Weighted ObjAr	Total of Weighted Areas of Objects (0+1*A+1.5*A^2)
6	Object	Mean Abs. Obj. Area	Mean of Absolute Object Area
7	Derived	Ratio Value	Ratio Value of Feature Variables 5 and 6 (Scale Factor 1 = 1.0)
8	Other	Store Object Pos.	Store Object Positions for Spot Marks, Clear Marks 0 (0 : No, 1 : Yes)
9	Derived	Integer Value	Scaled Rounded Integer Value of Feature 7 (Scale Factor 1 = 1.0)

OK Cancel

Classifier : test_yH2AX_AF555_70% S Grid Focus : FL40PL-C-ARP S ...
 Fine Focus : FL40PL-F S ...

Description : FOCI Measurement with Correction Factor

New Rename Delete Print Export Save OK Cancel

Capture Exposure Img Proc. FOV Proc. Img Qual. Cell Selection Cell Proc. Features Gallery Other

Store : Gallery Images ? Gallery Image Size : 5 288 Px Gallery Compression : LossLess 64 GL
 Raw Image ? Focus Planes ? Gallery Scale : 100 % Color Display Mode : Mixed Colors

	Display Color	Lower Thr. Algorithm	Lower Thr. Offset	Upper Thr. Algorithm	UT Sat. Area (1/100 μm²)	Maximum Gain (%)	Rel. Intensity (%)	Visible ?
CS :	[Color Selection]	Min. Intensity	0	Max. Intensity	10	300	50	<input checked="" type="checkbox"/>
S1 :	[Color Selection]	Min. Intensity	0	Max. Intensity	50	500	100	<input checked="" type="checkbox"/>

Display in Gallery Images :

	Channel	Feature	Prec.	Channel	Feature	Prec.
<input type="checkbox"/>	---	---	0	---	---	0
<input type="checkbox"/>	---	---	0	---	---	0
<input type="checkbox"/>	S1	2. NObj Rel. Int. Rng M (0.25,1)	0	---	---	0

Print OK Cancel

General Search Relocation Output Filters Microscope Motors Annotat. Other System

Reflector Cubes	Objective Lenses	Magnification	Oil	X Offset	Y Offset	Z Offset
#1 : FITC	#1 : Plan-Neofluar 2.5x/0.075	2.50	<input type="checkbox"/>	0	0	0
#2 : DAPI	#2 : Plan-Apochromat 10x/0.45	10.00	<input type="checkbox"/>	0	0	0
#3 : SpO	#3 : EC Plan-Neofluar 20x/0.5	20.00	<input type="checkbox"/>	0	0	0
#4 : Texas Red	#4 : EC Plan-Neofluar 40x/0.75	40.00	<input type="checkbox"/>	0	0	0
#5 : DEAC	#5 : EC Plan-Neofluar 100x/1.3 Oil	100.00	<input checked="" type="checkbox"/>	0	0	0
#6 : Cy5	#6 : EC Plan-Neofluar 63x/0.95 Ko	63.00	<input type="checkbox"/>	0	0	0
	#7 : Frei	0.00	<input type="checkbox"/>	0	0	0

Excitation Filters Transmission Filters Emission Filters