

Bestimmung der biologisch äquivalenten Dosis für die Mikrostrahltherapie

Quynh Mai Nguyen

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen
Universität München zur Erlangung einer
Doktorin der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Stefan Thorban

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Thomas E. Schmid
2. Priv.-Doz. Dr. Stefan Münch

Die Dissertation wurde am 11.07.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die TUM School of Medicine and Health am 08.11.2023 angenommen.

Abstract

Purpose: Microbeam therapy is a preclinical concept of spatially fractionated radiotherapy. In this approach, beams are collimated into parallel, planar beams a few micrometers wide and consist of high doses of several hundreds of Grays, while the doses of the regions between the beams remain below the tissue tolerance. Microbeam therapy has been shown to spare normal tissue better than conventional radiotherapy while maintaining equal tumor control, thereby increasing the therapeutic index. The underlying biological effects of microbeam therapy are not yet fully understood and dosimetry is challenging due in part to the microbeam geometry, which is in the micrometer range. The goal of this work is to use biological dosimetry to characterize microbeams in more detail, to detect possible biological mechanisms of microbeam therapy such as bystander effects, and to validate physical dosimetry by determining the biological dose in the peak- and valley regions.

Methods: Using various endpoints, DNA and the subsequent cytogenetic damage resulting from microbeam therapy was investigated and quantified in cell culture and reconstructed skin tissue. The established cytokinesis-block micronucleus assay with CHO-K1 cells was performed, which is one of the gold standards of biological dosimetry. It allows the detection of micronuclei as well as nucleoplasmic bridges. Furthermore, to investigate the effects in a three-dimensional construct, the foci for γ H2AX and 53BP1, as DNA double strand break markers, in the reconstructed skin tissue EpiCs were examined immunohistochemically 0.5 and 24 hours after irradiation with microbeams and homogeneous irradiation.

Results and Conclusion: This is the first study precisely determining the absorbed doses in the peaks and valleys of microbeams using the CBMN-Assay. The biological dosimetry with micronuclei and bridges agrees with the physical dose determined with Gafchrom film and could therefore validate physical dosimetry. The study clearly demonstrated that reconstructed skin tissue is well suited to study spatial resolution of DNA damage after microbeam therapy. Here, a higher 53BP1 foci number could be observed in the valleys compared to homogeneous irradiation, which could indicate possible bystander effects.

In summary, it was shown that the geometry of microbeams can be reliably reproduced in cell culture and three-dimensional tissue despite the dimensions in the micrometer range and that possible bystander effects might play a role in the underlying biological mechanisms of microbeam radiation therapy.

Zusammenfassung

Zielsetzung: Mikrostrahltherapie ist ein präklinisches Konzept der räumlich fraktionierten Strahlentherapie. Dabei werden Strahlen zu parallelen, ebenen und wenige Mikrometer breiten Strahlenbündel kollimiert und weisen hohe Dosen von mehreren Hundert Grays auf, während die Regionen zwischen den Strahlenbündeln durch niedrige Dosen gekennzeichnet sind. Es wurde gezeigt, dass Mikrostrahltherapie bei gleicher Tumorkontrolle das Normalgewebe besser schont als konventionelle Strahlentherapie und dadurch den therapeutischen Index erhöht. Die zugrundeliegenden biologischen Effekte der Mikrostrahltherapie sind noch nicht vollständig geklärt und die Dosimetrie stellt unter anderem aufgrund der Mikrostrahlgeometrie, welche sich im Mikrometerbereich bewegt, eine Herausforderung dar. Das Ziel dieser Arbeit ist es, anhand von biologischer Dosimetrie Mikrostrahlen genauer zu charakterisieren, mögliche biologische Mechanismen der Mikrostrahltherapie, wie Bystander-Effekte zu erfassen und durch die Bestimmung der biologischen Dosis in den Peaks und Valleys die physikalische Dosimetrie zu validieren.

Methoden: Anhand verschiedener Endpunkte wurden DNA-Schäden als Folge der Mikrostrahltherapie in Zellkultur und rekonstruiertem Hautgewebe untersucht und quantifiziert. Es wurde der etablierte Cytokinesis-block micronucleus-Assay mit CHO-K1 Zellen eingesetzt, welcher einer der Goldstandards der biologischen Dosimetrie darstellt. Dieser ermöglicht es, sowohl Mikrokerns als auch nukleoplasmatische Brücken zu erfassen. Des Weiteren wurde zur Untersuchung der Effekte im dreidimensionalen Raum die Foci für γ H2AX und 53BP1 im rekonstruierten Hautgewebe EpiCs immunhistochemisch 0,5 und 24 Stunden nach Bestrahlung mit Mikrostrahlen und homogener Bestrahlung untersucht.

Ergebnisse und Fazit: Es konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal mithilfe des CBMN-Assays die genaue absorbierte Dosis in den Peaks und Valleys der Mikrostrahlen bestimmt werden. Die biologische Dosimetrie mit Mikrokernen und Brücken stimmt mit der physikalischen Dosimetrie mit Gafchrom-Film überein und konnte diese somit validieren. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass rekonstruiertes Hautgewebe gut geeignet ist, um die örtliche Auflösung von DNA-Schäden nach Mikrostrahltherapie zu untersuchen. Hier konnte in den Valleys im Vergleich zu homogener Bestrahlung eine höhere 53BP1-Foci-Anzahl beobachtet werden, was auf mögliche Bystander Effekte hinweisen könnte. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Mikrostrahlgeometrie trotz der Dimensionen im Mikrometerbereich zuverlässig in Zellkultur und dreidimensionalem Gewebe wiedergegeben werden kann und mögliche Bystander-Effekte zu den zugrundeliegenden biologischen Mechanismen von Mikrostrahlen beitragen könnten.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	LET	linear energy transfer
ALI	air-liquid interface	MN	micronucleus/ micronuclei
ATM	ataxia-telangiectasia-mutated	MNZ	Monokukleäre Zellen
ATR	ataxia-telangiectasia and rad3-related	MRT	microbeam radiation therapy
Broadbeam	Bestrahlung mit homogenem Feld	NHEJ	non-homologous end-joining
BNZ	Binukleäre Zellen	NPB	nucleoplasmic bridges
ctc	center-to-center-distance	OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
DAPI	40,6-diamidino-2- phenylindole	PBS	Phosphate Buffered Saline
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PFA	Paraformaldehyd
DNA-PKc	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit	PMMA	Polymethylmethacrylat
DDR	DNA Damage Response	PVDR	peak-to-valley dose ratio
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	ROS	reactive oxygen species
FBS	fetal bovine serum, fetales rinderserum	RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
fpc	foci per cell	Sham	Kontrolle, die nicht bestrahlt wird
FWHM	full width at half maximum	TB Vf	tumor blood volume fraction
GJIC	gap junctional intercellular communication	TCTG-Puffer	Pufferlösung mit TRIS, Na- Casein, Tween20, Fischgelatine
HR	homologous recombination	VSI	Vessel size index
IQR	interquartile range	53BP1	p53-binding protein 1
		%cwf	cells with foci

Inhaltsverzeichnis

Abstract

Zusammenfassung

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Mikrostrahltherapie	1
1.2	Biologische Mechanismen in der Mikrostrahltherapie.....	3
1.3	Dosimetrie in der Mikrostrahltherapie	6
2	Zielsetzung	7
3	Material und Methoden	8
3.1	Zellkultur	8
3.1.1	Zelllinie	8
3.1.2	Splitting	8
3.1.3	Bestimmung der Verdopplungszeit anhand einer Wachstumskurve.....	8
3.1.4	Coating der Kammerobjektträger	9
3.1.5	Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) Assay	9
3.1.6	Auswertung	11
3.1.7	Bestrahlung und physikalische Dosimetrie	12
3.2	Immunhistochemie mit rekonstruiertem Hautgewebe.....	13
3.2.1	EpiCS – Hautgewebe	14
3.2.2	Fixierung und Einbettung.....	14
3.2.3	Immunfluoreszenzfärbung	15
3.2.4	Auswertung	15
3.2.5	Bestrahlung und physikalische Dosimetrie	16
3.3	Statistik	17
4	Ergebnisse.....	18
4.1	Biologische Dosimetrie mit Mikrokernen und Brücken in Zellkultur	18
4.1.1	Bestimmung der Inkubationszeit für Cytochalasin B für CHO-K1-Zellen.....	18
4.1.2	Binukleäre Zellen nach Broadbeam-Bestrahlung und MRT	20
4.1.3	Referenzkurven für die biologische Dosimetrie.....	22
4.1.4	Biologische Dosimetrie in situ für MRT.....	24
4.2	MRT mit rekonstruiertem Hautgewebe	29
4.2.1	DNA-Schäden im zeitlichen Verlauf 0,5 h und 24 h nach MRT	29
4.2.2	Räumliche Aufteilung der DNA-Schäden nach MRT	32

4.2.3	Untersuchung der Valleyregion auf mögliche Bystander-Effekte	35
5	Diskussion	37
5.1	Biologische Dosimetrie mit Mikrokernen und Brücken in Zellkultur	37
5.2	DNA-Schäden nach MRT im Hautgewebe	42
6	Fazit	47
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	48
	Literaturverzeichnis.....	49
	Danksagung	57

1 Einleitung

1.1 Mikrostrahltherapie

Strahlentherapie ist eine entscheidende Säule der Krebstherapie und wird gegenwärtig in etwa 50% aller Behandlungen verwendet (Allen et al., 2017). Obwohl es in den letzten Jahrzehnten viele Fortschritte in der Strahlentherapie gab, gibt es für eine Vielzahl von Tumoren immer noch keine hinreichende Therapie. Einen bedeutenden limitierenden Faktor stellt hierbei die Normalgewebstoxizität in den Risikoorganen dar (Fukunaga et al., 2021). Beispielsweise hat das Glioblastoma multiforme trotz optimaler Behandlung mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 5% eine sehr schlechte Prognose. Bei der Behandlung muss hier zwischen Tumorkontrolle und Schonung des umliegenden Gewebes und somit Reduzierung der resultierenden neurologischen Defizite abgewogen werden (Engels et al., 2020; Montay-Gruel et al., 2021). Dies stellt eine Herausforderung dar, was unter anderem an der Strahlenresistenz, der rasch proliferierenden, diffus infiltrativen Natur von Gliomzellen und an der Strahlensensitivität des Gehirnes liegt (Wong et al., 2015). Für die Behandlung bedarf es deswegen neuartiger Therapieansätze mit verbesserter Normalgewebstoleranz.

In 1992 wurde von Slatkin et al. mit der Mikrostrahltherapie (MRT *Microbeam radiation therapy*) eine neue Methode in der Strahlentherapie eingeführt (Slatkin et al., 1992). Diese Methode basiert auf dem Prinzip der räumlichen Fraktionierung in der Strahlentherapie, die von Alban Koehler am Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckt wurde (Grotzer et al., 2015). In der Mikrostrahltherapie werden Strahlen zu parallelen, ebenen und wenige Mikrometer breiten Strahlenbündeln (Peaks) kollimiert (Abb. 1), welche mit einer hohen Dosis von mehreren Hundert Grays (350-1000 Gy) auf das Tumorgewebe appliziert werden. Die Regionen zwischen den Peaks werden als Valleys bezeichnet und sind hingegen durch eine niedrige Dosis (5-20 Gy) gekennzeichnet (Ibahim et al., 2014), wobei die Dosis hier aus der Streuung sekundärer Elektronen und Photonen der angrenzenden Peaks resultiert (Serduc et al., 2009). Die Peaks besitzen eine Peakbreite von etwa 25-50 μm und einen Abstand (*ctc center-to-center-distance*) von üblicherweise 200-400 μm (Grotzer et al., 2015), wobei diese Parameter durch das verwendete Kollimatordesign bestimmt werden (Ibahim et al., 2014). Eine hohe Dosisrate ist hierbei bedeutend, um eine möglichst kurze Bestrahlungszeit zu erreichen. Durch eine möglichst kurze Bestrahlungszeit wird eine bewegungsinduzierte Verzerrung der Mikrostrahlgeometrie minimiert und eine präzise Applikation von Mikrostrahlen gewährleistet. Bisher ist es nur durch die von Synchrotron-Anlagen produzierte High-Flux Bestrahlung

möglich, die Bedingung von nahezu parallelen Mikrostrahlen und sehr hohe Dosisraten zu erfüllen (Schültke et al., 2017). Um Experimente auch außerhalb von großen Synchrotron Anlagen zu ermöglichen, wird in neuerer Zeit an zugänglicheren Methoden für MRT geforscht, wobei bereits mehrere alternative Strahlquellen für Mini- und Mikrostrahlen vorgeschlagen wurden (Esplen et al., 2018; Prezado et al., 2017; Treibel et al., 2021).

Es wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass Mikrostrahltherapie eine bemerkenswerte Tumorkontrolle zeigt, während die Normalgewebestoxizität reduziert wird. So ist es möglich, Dosen von Hunderten Grays zu applizieren, ohne Gewebenekrosen hervorzurufen (Laissue et al., 2007; Serduc et al., 2006; Slatkin et al., 1995). Es wurden verschiedene Studien mit intrazerebralen 9L Gliosarkomen in Ratten durchgeführt: Laissue et al. zeigten, dass durch die Bestrahlung mit Mikrostrahlen das Tumorwachstum verlangsamt und eine Ablation des Tumors in mehr als der Hälfte der Ratten erreicht wurde (Laissue et al., 1998). In Bouchart et al. wurde im Vergleich zu unbestrahlten Ratten eine signifikant höhere mittlere Überlebenszeit beobachtet mit einer vorübergehenden Unterdrückung des Tumorwachstum um einen Faktor von 17 (Bouchet et al., 2010). Im Vergleich zu Broadbeam-bestrahlten Ratten (Bestrahlung mit einem homogenen Feld) konnten Dilmanian et al. unter der Verwendung von verschiedenen Mikrostrahlgeometrien und Dosen eine bis zu 5-fach längere mittlere Überlebenszeit mit einer bemerkenswerten Normalgewebstoleranz nach MRT nachweisen (Dilmanian et al., 2002). In einer Studie mit Embryos von Enten wies das Hirngewebe nach MRT im Vergleich zu Broadbeam-Bestrahlungen zudem eine 3-fach höhere Toleranz auf (Dilmanian et al., 2001). Diese Ergebnisse suggerieren einen höheren Therapieindex von MRT im Vergleich zu Broadbeam-Bestrahlungen.

Für die Gewährleistung einer guten Tumorkontrolle und Normalgewebstoleranz ist ein wichtiger Parameter in der Mikrostrahltherapie das Verhältnis zwischen Peakdosis und Valleydosis (PVDR *peak-to-valley dose ratio*). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Valleydosis für die Normalgewebstoleranz von besonderer Bedeutung ist (Smyth et al., 2016), wobei eine niedrige Valleydosis eine bessere Schonung des Normalgewebes aufweist (Dilmanian et al., 2003, 2002; Mukumoto et al., 2017; Zhong et al., 2003). Die Dosis in den Valleys sollte dabei einen bestimmten Grenzwert nicht übersteigen, um eine hinreichende Reparatur zu gewährleisten, und ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie der Photonenenergie, der Kollimatorgeometrie (Anzahl der Mikrostrahlen, Mikrostrahlbreite, etc), dem Bestrahlungsfeld, der Peakdosis und der Tiefe, Form und Zusammensetzung des zu bestrahlenden Tumors und des umgebenden Gewebes (Bräuer-Krisch et al., 2005; Serduc et al.,

2009). Gleichzeitig ist eine hohe Peakdosis für die Tumorkontrolle entscheidend (Laissue et al., 1998). Eine hohe PVDR ist deswegen ein wichtiger limitierender Faktor in der klinischen Anwendung von Mikrostrahlen.

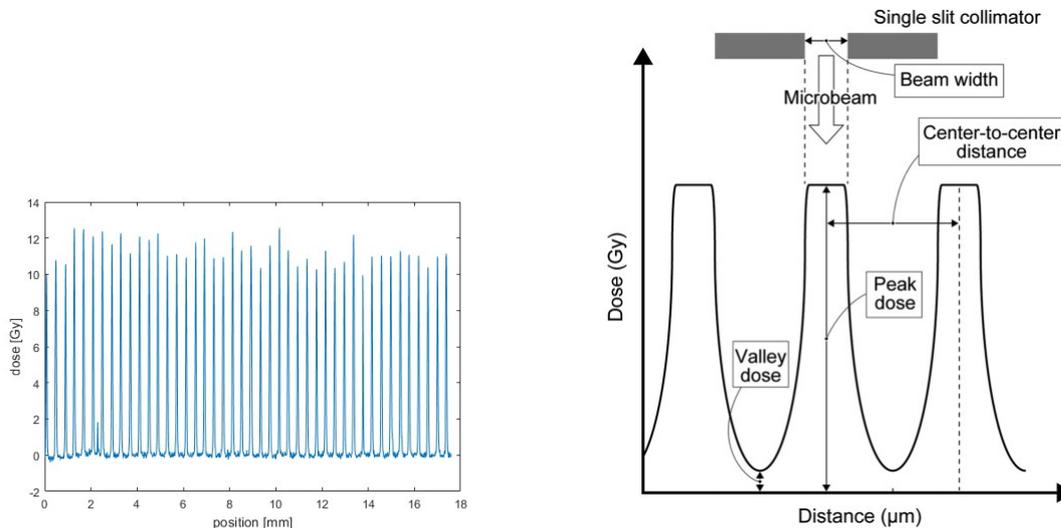


Abbildung 1: Schematische Abbildung von Mikrostrahlen. (Links: bereitgestellt von Franziska Treibel, rechts: Uyama et al., 2011) Links: Dosisprofil entlang der x-Achse. Rechts: Schematische Darstellung der Mikrostrahlgeometrie, anders als in der Abbildung wurde in dieser Arbeit ein Multi-Slit Kollimator verwendet.

1.2 Biologische Mechanismen in der Mikrostrahltherapie

Wie bereits im vorherigen Kapitel erläutert, ermöglicht Mikrostrahltherapie im Vergleich zu konventioneller Strahlentherapie die Bestrahlung von Tumoren mit sehr hohen Dosen bei ausgezeichneter Schonung des Normalgewebes. Die biologischen Effekte hierfür sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Dadurch dass die Dosen in der Mikrostrahltherapie hauptsächlich in den Mikrometer breiten Peaks appliziert werden, spielt hier der Volumen-Effekt eine Rolle, bei der die Normalgewebstoleranz mit steigendem Bestrahlungsvolumen sinkt (Rodney Withers et al., 1988). Dilmanian et al. verglichen in einer Studie die Normalgewebstoleranz von Broadbeam-Bestrahlung und MRT und kamen zu dem Ergebnis einer 3 bis 4-fach höheren Toleranz für Mikrostrahlen, auch unter Berücksichtigung des Volumenfaktors (Verhältnis der Dosis in den Peaks zur integrierten Dosis). Dies deutet darauf hin, dass außer dem Volumen-Effekt weitere biologische Effekte in der Mikrostrahltherapie mitwirken (Dilmanian et al., 2002, 2001). Ein Überblick über verschiedene Mechanismen wird in der Publikation von Fukunaga et al. gegeben (Fukunaga et al., 2021).

Vaskuläre Effekte: Durch starke pro-angiogenetische Signale kommt es in Tumoren zu einer abnormalen Gefäßbildung. Das Tumorgefäßsystem ist gekennzeichnet durch eine unzureichende Gefäßorganisation sowie einer schlecht ausgebildeten Gefäßstruktur unter anderem mit einer sehr schneller Endothelproliferation und Permeabilität. Dieses im Gegensatz zum Normalgewebe inadäquate Gefäßsystem führt zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber verschiedenen Behandlungsstrategien (Denekamp, 1990). Mehrere Studien deuten darauf hin, dass vaskuläre Effekte durch eine bevorzugte Wirkung der Mikrostrahlen auf Tumorgefäße eine wichtige Rolle in der Behandlung mit Mikrostrahlen einnehmen. So konnte in Bouchet et al. nach Bestrahlung von 9L Gliosarkomen in Ratten festgestellt werden, dass es in der zweiten Woche nach MRT zu einer signifikanten Verringerung der Fraktion des Tumorblutvolumens (TBVf *tumor blood volume fraction*) kommt. Dabei korreliert die Verringerung des TBVf und des mittleren Durchmessers der Gefäße (VSI *vessel size index*) mit der Reduktion der Tumorgröße nach Bestrahlung, wobei keine Unterschiede im bestrahlten Normalgewebe festzustellen sind (Bouchet et al., 2010). Nach MRT kann im Normalgewebe eine ausreichende Perfusion aufrechterhalten werden, während es im Tumorgewebe durch das Remodeling von Tumorgefäßen zu einer Hypoxie kommt (Bouchet et al., 2013a).

Migration von Stammzellen: Stammzellen sind in der Erhaltung von Normalgewebe von großer Bedeutung (Fabbrizi et al., 2018). In einer Studie von Fukunaga et al. wurden ex-vivo Testis-Organokulturen von Acr-GFP transgenen Mäusen bestrahlt, wobei GFP ein spezifischer Marker für Meiosis ist, welcher zur Überwachung der Spermatogenese verwendet wird. Es wurde beobachtet, dass die Spermatogenese nach MRT im Gegensatz zu Bestrahlung mit Broadbeam nicht beeinträchtigt wurde, wobei das Vorhandensein von unbestrahlten Stammzellen und deren Migration für die Schonung des Gewebes zur Erhaltung einer intakten Spermatogenese nach MRT notwendig ist (Fukunaga et al., 2019).

Immuneffekte: Um die zugrundeliegenden Mechanismen für die Mikrostrahltherapie zu verstehen, wurden unterschiedliche Studien zur Untersuchung möglicher Immuneffekte durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die Bestrahlung mit Mikrostrahlen im Vergleich zu Broadbeam-Bestrahlung zu einer unterschiedlichen Regulierung von Genexpression und molekularen Signalwegen führt, die das Immunsystem betreffen (Sprung et al., 2012; Yang et al., 2014). Mehrere Experimente mit EMT6.5-Mammatumoren in vivo und in vitro wurden durchgeführt. Yang et al. konnten dabei zeigen, dass sich die Immuninfiltrate in Mamma-Tumoren wesentlich zwischen MRT und Broadbeam-Bestrahlung unterscheiden. Es kommt nach konventioneller Bestrahlung im Vergleich zu MRT zu einem Anstieg an tumorassoziierten

Makrophagen und Neutrophilen, wohingegen MRT zu einer größeren Anzahl an T-Zellen und einem höheren Level an proinflammatorischen Genen in Tumoren führt (Yang et al., 2019).

Bystander-Effekte: Während in der Mikrostrahltherapie nur ein kleiner Anteil an Zellen bestrahlt und dadurch direkt beschädigt wird, wurden auch Effekte in unbestrahlten Zellen beobachtet. Diese Effekte werden Bystander-Effekte genannt und können durch Signale ausgehend von bestrahlten Zellen ausgelöst werden (Nagasawa and Little, 1999). So wurden in einer vielzitierten Studie CHO-Zellen mit alpha-Teilchen bestrahlt. Obwohl nur etwa 1% aller Zellen bestrahlt wurde, wurden DNA-Schäden in Form von Schwester-Chromatid-Austausch in 30% aller Zellen beobachtet (Nagasawa and Little, 1992). Als zugrundeliegende Mechanismen sind zum einen die direkte Zellkommunikation durch Gap-junctions (*GJIC gap junctional intercellular communication*) und zum anderen die Freisetzung löslicher Faktoren von direkt bestrahlten Zellen aufzuführen. Mögliche Mediatoren sind unter anderem Zytokine wie Tumornekrosefaktor-alpha, freie Radikale (ROS *reactive oxygen species*) und reaktive Stickstoffspezies wie Stickstoffmonoxid NO (Prise and O'Sullivan, 2009). Nach gezielter Bestrahlung des Zytoplasmas von Glioblastom-Zellen mit Helium-Ionen kam es sowohl in benachbarten Tumorzellen als auch in benachbarten Normalgewebszellen zu einem erhöhten Chromosomenschaden, wobei hier die Anzahl von Mikrokernen als Endpunkt genommen wurde. Bystander-Effekte entstehen folglich nicht nur durch direkten DNA-Schaden, sondern auch nach Bestrahlung des Zytoplasmas (Shao et al., 2004). Es wurde neben Effekten in unmittelbarer Nähe von bestrahlten Zellen auch eine Wirkung auf unbestrahlte Zellen in größerer Reichweite, sogenannte out-of-field oder abkopale Effekte beschrieben. Fernandez-Palomo et al. konnten zeigen, dass die Bestrahlung einer Gehirnhälfte von Mäusen sowohl nach Broadbeam-Bestrahlung als auch nach MRT zu abkopalen Effekten in der Urinblase führt, gemessen an dem verringerten klonogenen Überleben von HaCat Reporterzellen. Bei Vorhandensein eines Tumors ist hier jedoch kein signifikanter Unterschied festzustellen. Die Mäuse hatten kein erworbenes Immunsystem, was darauf hindeuten könnte, dass hier das angeborene Immunsystem eine Rolle spielt (Fernandez-Palomo et al., 2016). Im Review von Zhang et. al kann ein Überblick über verschiedene Studien zum Bystander-Effekt mit Mikrostrahlen gefunden werden (Zhang et al., 2022).

1.3 Dosimetrie in der Mikrostrahltherapie

Bei der Dosimetrie geht es um das Messen der absorbierten Dosis, die aus der Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit Materie resultiert (Attix, 2007). Die Dosimetrie in der Mikrostrahltherapie gestaltet sich schwieriger als in konventioneller Radiotherapie. Die Dosimetrie muss die genaue Erfassung der Mikrostrahlgeometrie im Bereich von Mikrometern gewährleisten und eine große Spannweite, die die Dosen in den Peaks und Valleys umfassen, abdecken. Für physikalische Dosimeter ist außerdem die Dosisrate zu beachten, da eine hohe Dosisrate zu einer Sättigung des Detektors führen kann (Bräuer-Krisch et al., 2015; Pelliccioli et al., 2019).

Theoretische Dosisberechnungen werden anhand von Monte-Carlo-Simulationen durchgeführt, einer statistischen Methode zur Berechnung des Strahlentransportes basierend auf der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Wechselwirkungen von Photonen bei Durchgang durch Materie und Simulationen anhand von randomisierten Nummern (Wood et al., 2013). Daneben wird in der experimentellen Dosimetrie zwischen physikalischer und biologischer Dosimetrie unterschieden. Eine gut etablierte Methode in der physikalischen Dosimetrie ist die Dosimetrie mit Gafchrom-Filmen. Radiochrome Filme besitzen eine Schicht bestehend aus kristallinen Polyacetylenen. Hier kommt es nach Bestrahlung durch Polymerisation zu einem Farbwechsel. Die dadurch resultierende optische Dichte ist proportional zu der absorbierten Dosis und kann bei Bestrahlungen mit Mikrostrahlen mit Hilfe von Mikrodensimetern oder Systemen gekoppelt mit einem optischen Mikroskop erfasst werden (Bräuer-Krisch et al., 2015; Williams and Metcalfe, 2011). Die biologische Dosimetrie erfasst dagegen nicht die Dosis an sich, sondern die Folgen ionisierender Strahlung auf zellulärer Ebene. Dadurch können biologische Schäden quantifiziert und so auf die absorbierte Dosis geschlossen werden (Bundesamt für Strahlenschutz, 2020). Diese Methode wird bei nukleären Unfällen und radiologischen Notfällen verwendet, um die Dosis abzuschätzen und kann bei der Triagierung, dem Screening, dem klinischen Management und bei der langfristigen Risikoabschätzung behilflich sein (Swartz et al., 2014). Biologische Dosimetrie kann unabhängige Informationen über die Dosis liefern und dabei die physikalische Dosimetrie ergänzen oder ersetzen (Romm et al., 2011). Zytogenetische Biomarker, wie dizentrische Chromosomen und Mikrokerne werden dabei als sensitivste und zuverlässigste Endpunkte angesehen. Ionisierende Strahlung kann in den Zellen zu DNA-Strangbrüchen führen. Werden diese Schäden nicht hinreichend repariert, kommt es zu abnormalen Chromosomenstrukturen, welche mit der Dosis korrelieren und zur Bewertung der Dosis identifiziert und quantifiziert werden können (Ricoul et al., 2017).

2 Zielsetzung

Die zugrundeliegenden biologischen Effekte der Bestrahlung mit Mikrostrahlen sind noch nicht hinreichend aufgeklärt. Zudem erweist sich die Dosimetrie im Mikrometerbereich als schwierig. Eine genaue Abbildung der biologischen Dosis kann die physikalische Dosimetrie ergänzen, bei der Optimierung der Behandlungsplanung helfen und durch die Erfassung möglicher biologischer Effekte zum Verständnis der Wirkung von Mikrostrahlen beitragen. Dabei spielt vor allem die Bestimmung der Valleydosis eine wichtige Rolle, da diese einen entscheidenden Faktor für die Bestrahlung mit Mikrostrahlen darstellt (Smyth et al., 2016). Um die genaue absorbierte Dosis in den Peaks und Valleys der Mikrostrahlen zu erfassen und die physikalische Dosimetrie zu verifizieren, wurde in dieser Arbeit mithilfe von biologischer Dosimetrie Chromosomenfragmente in Folge von DNA-Schäden nach MRT untersucht und mit einer Referenzkurve verglichen. Dazu wurde der Cytokinesis-block micronucleus Assay mit Mikrokernen und Brücken als Endpunkte verwendet. Um eine realitätsgetreuere Abbildung mit Darstellung von Gewebe im dreidimensionalen Raum und entsprechenden Zellkontakten zu erhalten (Antoni et al., 2015), wurde des Weiteren rekonstruiertes Hautgewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Mikrostrahlen bestrahlt. Die räumliche Auflösung und der zeitliche Verlauf der resultierenden DNA-Schäden wurden immunhistochemisch anhand von γ H2AX und 53BP1-Foci als Marker untersucht. Von großem Interesse sind auch die zugrundeliegenden biologischen Mechanismen der Mikrostrahltherapie. Um mögliche Bystander-Effekte im Hautgewebe zu detektieren, wurde dafür anschließend die Anzahl der Foci in den Valleys nach MRT bestimmt und mit der Anzahl der Foci nach homogener Bestrahlung verglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinie

Für die nachfolgenden Experimente in Zellkultur wurde die bewährte Normalgewebslinie CHO-K1 Hamsterzellen benutzt (bereitgestellt vom Department der Radioonkologie und Strahlentherapie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München). Die Zellen wurden im RPMI-1640 Wachstumsmedium mit 10% FBS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin und 1% Sodumpyruvat (alle von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) und bei einer Temperatur von 37°C und 5,0% CO₂ kultiviert.

3.1.2 Splitting

Die Zellen wurden 2–3-mal wöchentlich gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit 5 mL PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) gewaschen und für 3,5 Minuten mit 2 mL Trypsin + 0,02% EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) bei 37°C und 5,0% CO₂ inkubiert. Um das Trypsin zu stoppen, wurde für ein Splitting-Verhältnis von 1:50 3 mL Medium hinzugefügt und 100 µL davon in eine neue T75 Flasche mit 9 mL Medium hinzugefügt.

3.1.3 Bestimmung der Verdopplungszeit anhand einer Wachstumskurve

Für den Mikrokerntest (3.1.5) ist es wichtig, die passende Inkubationszeit mit Cytochalasin B zu erfassen. Um mit Cytochalasin B eine möglichst große Anzahl an binuklären Zellen zu induzieren, muss zunächst die Verdopplungszeit mithilfe einer Wachstumskurve bestimmt werden. Es wurden dazu 100.000 Zellen/Well in einer 6-well Platte (TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz) ausgesät und bei 37°C und 5,0% CO₂ inkubiert. Nach jeweils 24, 48, 96, 120 und 144 Stunden wurden die Wells mit 1mL PBS gespült und die Zellen zur Ablösung mit 1 mL Trypsin + 0,02% EDTA für 3,5 min bei 37°C und 5,0% CO₂ inkubiert. Nachdem 3 mL Medium hinzugefügt worden war, wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Pro Zeitpunkt wurden 3 Wells ausgesät. Alle Wells wurden dabei jeweils dreimal

gezählt, wobei alle vier Quadrate der Zählkammer verwendet wurden. Mit nachfolgender Formel wurde die Verdopplungsrate t_v der Zellen berechnet:

$$t_v = (t_2 - t_1) \times \frac{\log(2)}{\log(n_2) - \log(n_1)}$$

Die Zeit t wurde in Stunden angegeben und für n_2 (Zellzahl bei t_2) und n_1 (Zellzahl bei t_1) der steilste Teil der Wachstumskurve betrachtet.

3.1.4 Coating der Kammerobjektträger

Für den Mikrokern-Test (3.1.5) wurden Kammerobjektträger (Nunc® Lab-Tek® II Chamber Slide™ system, 2 wells, Thermofisher, Massachusetts, USA) verwendet. Um die räumliche Auflösung der Mikrokerne zu erhalten, ist es essenziell, dass die Zellen an Ort und Stelle bleiben. Dafür wurden Kammerobjektträger mit Corning Cell-Tak (1,2 mg/mL #354240, Corning, USA) gecoatet. Gemäß der Herstellerangabe wurde Cell-Tak mit sterilem 0,1 M NaHCO₃-Puffer verdünnt, um eine Konzentration von 0,02 mg/mL zu erreichen. Die Kammerobjektträger wurden mit jeweils 700 µL Cell-Tak befüllt und nach 20-minütiger Einwirkzeit zweimal mit sterilem Wasser ausgewaschen.

3.1.5 Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) Assay

Für die biologische Dosimetrie wurde die etablierte Methode, der Mikrokern-Test mit Cytochalasin B, dem sogenannten Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) Assay verwendet. Hierbei werden Mikrokerne (MN *Micronucleus/ Micronuclei*) als biologischer Endpunkt benutzt und so die Quantifikation der Strahlenbelastung ermöglicht (Bundesamt für Strahlenschutz, 2020). Gleichzeitig können mit dem Assay nukleoplasmatische Brücken (NPB *nucleoplasmic bridges*) ausgewertet werden. Eine schematische Darstellung der Entstehung von MN und NPB ist in Abbildung 2 dargestellt.

Mikrokerne: Mikrokerne bestehen aus azentrischen Chromosomenfragmenten, Chromatidfragmenten oder ganzen Chromosomen, die während der Anaphase der Mitose nicht in die Tochterzellkerne eingeschlossen und schließlich von einer eigenen Kernmembran umhüllt wurden. Dabei können Chromosomenfragmente und Chromatidfragmente durch fehlerhaft reparierte oder nicht reparierte DNA-Schäden, wie Doppelstrangbrüche (DSB *DNA*

double-strand break), entstehen (Fenech et al., 2011). Mikrokerne, die ganze Chromosome beinhalten, entstehen durch Malsegregation während der Anaphase, unter anderem resultierend aus fehlerhaften Zellzyklus-Kontrollgenen, Defiziten des Spindelapparates oder der Kinetochore, mechanischen Störungen oder Hypomethylierung der zentromeren DNA (Mateuca et al., 2006). Auch im Rahmen eines Bruches von NPB können mehrere Fragmente entstehen, die sich im nächsten Zellzyklus als MN präsentieren (Hoffelder et al., 2004). Die resultierenden Mikrokerne haben, abgesehen von der kleineren Größe, eine ähnliche Morphologie wie die Tochterzellkerne (Fenech et al., 2011).

Brücken: Brücken entstehen, wenn die Zentromere von dizentrischen Chromosomen während der Anaphase in entgegengesetzter Richtung zu den Spindelpolen gezogen werden. Dizentrische Chromosomen können dabei entweder durch Fehlreparaturen von DNA-Strangbrüchen oder durch Fusionen der Enden der Telomere hervorgerufen werden. Wird die Zytokinese während des CBMN-Assays blockiert, werden die Chromosomen durch eine Kernmembran umhüllt und bilden so eine nukleoplasmatische Brücke (Fenech, 2007).

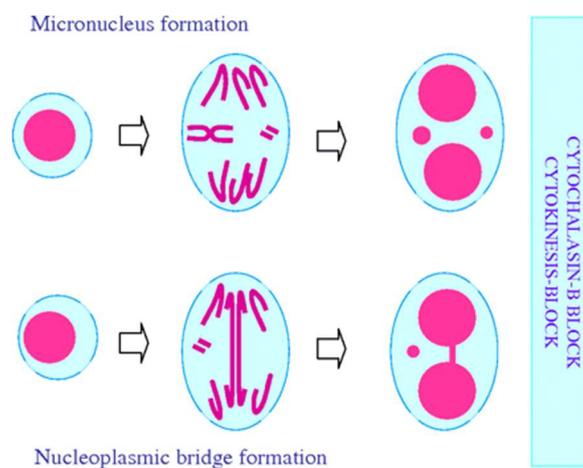


Abbildung 2: Entstehung von Mikrokerneln und nukleoplasmatischen Brücken während der Kernteilung. (Fenech et al., 2011) Obere Reihe: Entstehung von Mikrokerneln, Untere Reihe: Entstehung von nukleoplasmatischen Brücken

Für den CBMN-Assay wurden 6×10^4 Zellen in Zwei-Kammerobjektträger mit einer Seeding-Area von $20\text{mm} \times 20\text{mm}$ ausgesät und nach einer Inkubationsphase von 24 Stunden bestrahlt (3.1.7). Nach der Bestrahlung wurde das Medium mit neuem RPMI-1640 Medium und Cytochalasin B in einer Konzentration von $3 \mu\text{g/mL}$ ersetzt und bei einer Temperatur von 37°C und $5,0\%$ CO_2 inkubiert. Das Hinzufügen von Cytochalasin B gleich nach der Bestrahlung führt durch die Blockierung der Zytokinese zur Ausbildung von binukleären Zellen, was die Analyse von Mikrokernen ausschließlich in Zellen, die nur eine einzige nukleäre Teilung nach Bestrahlung vollführt haben, ermöglicht (Rodrigues et al., 2018). Für die Inkubationszeit mit Cytochalasin B wurden 27 Stunden festgelegt, basierend auf Vorversuchen mit dem CBMN-Assay und der vorher bestimmten Verdopplungszeit der CHO-K1 Zellen (Kapitel 3.1.3 und 4.1.1). Nachdem die Zellen für 5 Minuten mit 1mL PBS gewaschen wurden, wurde tröpfchenweise kaltes KCL ($0,075\text{ M}$, Thermofisher, Massachusetts, USA) hinzugefügt, die Zellen anschließend mit eiskaltem Methanol und Essigsäure in einem Verhältnis von 3:1 fixiert und über Nacht getrocknet. Die Färbung erfolgte mit Höchst (Invitrogen™ Höchst 33342, 10 mg/mL) gemäß der Herstelleranleitung. Dazu wurde Höchst mit PBS zu einer Konzentration von $1,5 \mu\text{g/mL}$ verdünnt und jeweils $800 \mu\text{L}$ in die Kammerobjektträger gegeben. Nach 10 Minuten abgedeckt in Alufolie wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zum Trocknen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zum Schluss wurden die Kammern entfernt und die Objektträger mit einem lichtbeständigen Eindeckmedium (Vectashield H-1000, Vector Laboratories, Inc., Newark, United States) und einem Coverslip ($24 \times 60\text{ mm}$) abgedeckt. Die Slides wurden im Gefrierfach bei -20°C aufbewahrt.

3.1.6 Auswertung

Für die Auswertung wurden die Mikrokerne und binukleäre Zellen mithilfe von Metafer (Metasystems, Altlußheim, Deutschland) am Fluoreszenzmikroskop Axio Observer 7 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) automatisch analysiert und die genauen Koordinaten der Zellen bestimmt. Nach automatischer Analyse wurden die Mikrokerne nochmal manuell nachgeprüft. Das Scoring der Brücken erfolgte manuell. Dabei wurden jeweils stets mindestens 1000 Zellen ausgewertet. Für das Scoring der binukleären Zellen, der Mikrokerne und Brücken wurden die Kriterien nach Fenech et al., 2003 verwendet: Binukleäre Zellen sollten zwei Zellkerne mit intakter Kernmembran besitzen und sich innerhalb derselben zytoplasmatischen Grenze befinden. Dabei sollten die Zellkerne ungefähr gleicher Größe und Färbungsintensität sein und sich berührende Zellkerne klar abzugrenzen sein. Mikrokerne sollten rund oder oval sein und

der Durchmesser zwischen $1/16$ und $1/3$ des mittleren Durchmessers der Zellkerne betragen. Sie sollten nicht mit den Zellkernen verbunden sein, jedoch können sie die Zellkerne berühren, nicht aber überlappen. Brücken sollten eine ununterbrochene nukleoplasmatische Verbindung zwischen den Zellkernen darstellen. Hierbei können sie unterschiedlicher Breite sein, jedoch überschreitet diese meist nicht $1/4$ des Durchmessers der Zellkerne. Die vollständigen Kriterien sind in der Publikation von Fenech et al. umfassend ausgeführt (Fenech et al., 2003).

Um Informationen über die räumliche Aufteilung der Mikrokerne nach Bestrahlung mit Mikrostrahlen zu erhalten, wurde mithilfe von Matlab (Natick, MA, USA) (Code bereitgestellt von Dr. Stefan Bartzsch) die Positionen der Zellen relativ zum nächsten Mikrostrahl-Zentrum in Bins von $12,5 \mu\text{m}$ ausgewertet.

3.1.7 Bestrahlung und physikalische Dosimetrie

Die Bestrahlung wurde mit Röntgenstrahlung durchgeführt. Die Spannung betrug bei allen Bestrahlungen 225 kV und der Röhrenstrom 13 mA. Für die Referenzkurve wurden Broadbeam-Bestrahlungen mit einer Dosisrate von $7,2 \text{ Gy/min}$ durchgeführt. Die Proben wurden mit Dosen von 0 Gy bis 4 Gy bestrahlt.

Um Mikrostrahlen zu produzieren, wurde ein Multi-Slit Kollimator in den Kleintierbestrahler XenX (Xstrahl, Camberley, UK) am Helmholtz-Institut München eingebaut (Treibel et al., 2021). Dabei wurde für die Bestrahlung ein großer Fokuspunkt verwendet und es wurde der Kupferfilter eingesetzt. Der ctc-Wert betrug $400 \mu\text{m}$ und die Schlitzweite $50 \mu\text{m}$. Um die Dosisrate zu erhöhen und eine Schlitzbreite von $50 \mu\text{m}$ zu erhalten, wurden die Kammerobjektträger direkt auf der Oberfläche des Kollimators platziert und von unten bestrahlt. Während der Bestrahlung wurden die Kammerobjektträger mit 2 mL Medium bedeckt, um die Zellen vor dem Austrocknen zu schützen. Vor den Experimenten wurde eine Filmdosimetrie von Franziska Treibel durchgeführt: Zugeschnittene Stücke eines EBT3 Films wurden in die Kammerobjektträger gelegt und durch ein Stück PMMA bedeckt, welches dasselbe Volumen hatte wie auch 2 mL Medium. Anhand der Ergebnisse einer Peak-Dosisrate von $3,05 \text{ Gy/min}$ und einer Valley-Dosisrate von $0,075 \text{ Gy/min}$ wurden die Kammerobjektträger 39 Sekunden für eine Peak Dosis von 2 Gy und 1600 Sekunden für eine Valley Dosis von 2 Gy bestrahlt. Es wurde für jede Dosis und für jede Bestrahlungsmodalität jeweils 3 Wiederholungen angefertigt.

3.2 Immunhistochemie mit rekonstruiertem Hautgewebe

Um eine realitätsgetreuere Abbildung im dreidimensionalen Raum zu erreichen, in dem unter anderem auch Zell zu Zell Interaktionen erhalten sind (Antoni et al., 2015), wurden Experimente an rekonstruiertem Hautgewebe vorgenommen. γ H2AX und 53BP1-Foci wurden dabei zur Visualisierung der DNA-Doppelstrangbrüche durch Immunfluoreszenzfärbung verwendet.

γ H2AX: Kommt es zu DNA-Schäden in eukaryotischen Zellen, werden die Serin-Threonin Kinasen ATM (ataxia-telangiectasia–mutated), ATR (ataxia-telangiectasia and rad3–related) und DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit) aktiviert, welche eine Antwort auf DNA-Schäden (DDR *DNA Damage Response*) einleiten. Ein wichtiger Schritt ist die Phosphorylierung von Serin 139 der Histonvariante H2AX, welche dann nach Phosphorylierung γ H2AX genannt wird. Im Rahmen der DDR kommt es zur Ausbildung von γ H2AX-Domänen über Megabasen des Chromatins, das den Doppelstrangbruch umgibt (Collins et al., 2020). γ H2AX spielt hier eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von DNA-Reparatur-Proteinen an die Stelle des DNA-Schadens (Scully and Xie, 2013). Durch spezifische Antikörper kann γ H2AX erkannt werden und als Biososimeter verwendet werden. Anhand von Immunfluoreszenz ist es so möglich, die Nummer an DSB-Foci und so die DDR innerhalb des Zellkerns zu evaluieren (Matthaios et al., 2012).

53BP1: Für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen sind als Hauptwege der DNA-Reparatur HR (homologous recombination) und NHEJ (non-homologous end-joining) zu nennen. 53BP1 (Tumor suppressor p53-binding protein 1) ist ein zentraler DNA-Reparatur Faktor und fördert den NHEJ-Weg, während der HR-Weg verhindert wird. Als Antwort auf einen Doppelstrangbruch akkumuliert 53BP1 im benachbarten Chromatin und bildet dabei nukleare Foci. Dabei dient 53BP1 als wichtiger Mediator für die Rekrutierung nachfolgender Reparaturfaktoren (Mirza-Aghazadeh-Attari et al., 2019).

Die nachfolgenden Methoden und Materialien für die Experimente am Hautgewebe wurden durch das Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland bereitgestellt und in Zusammenarbeit mit dieser (Prof. Harry Scherthan, Jessica Müller, Steffen Müller, Lisa Marie Fees und Sarah Schoof) durchgeführt.

3.2.1 EpiCS – Hautgewebe

Verwendet wurden in den nachfolgenden Experimenten Phenion® epiCS – Hautgewebe (Henkel AG & Co., Düsseldorf, DE), das von der OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) für die Testung hautkorrosiver (OECD, 2019) und hautirritierende (OECD, 2021) Eigenschaften anerkannt ist. Das dreidimensionale Hautmodell hat eine Fläche von 0,6 cm² und wird aus primären menschlichen epidermalen Keratinozyten rekonstruiert, die auf einem Polycarbonat Filter unter air-liquid interface (ALI) – Bedingungen gezüchtet werden (Steinmeyer et al., 2022) und so zu einer mehrschichtigen Epidermis mit Verhornung differenzieren. Die Hautmodelle weisen eine hohe Ähnlichkeit mit menschlicher Epidermis auf und bestehen ebenfalls aus einer unteren Basalzellschicht, einer Schicht mit proliferierenden Keratinozyten und einer Hornschicht (Phenion, 2014).

Gemäß der Herstelleranleitung wurde bei Erhalt der Hautgewebe zunächst 1 mL kaltes epiCS Kulturmedium in jeweils ein Well einer 6-Well Platte pipettiert. Die Hautgewebe wurden unter sterilen Bedingungen mit einer Einmalpinzette in die mit Medium befüllten Wells der 6-Well Platte transferiert und zunächst für 24 Stunden bei 37°C und 5,0% CO₂ inkubiert.

Die nachfolgenden Methoden für die Fixierung, Einbettung (3.2.2), Immunhistochemie (3.2.3) und Auswertung (3.2.4) der Hautmodelle wurden bereits ausführlich von Ahmed et al. und Scherthan et al. beschrieben (Ahmed et al., 2012; Scherthan et al., 2022).

3.2.2 Fixierung und Einbettung

Nach der Bestrahlung wurden die Hautmodelle für 0,5 und 24 Stunden bei 37°C und 5,0% CO₂ inkubiert und zum Fixieren anschließend mit 4%-PFA durchsetzt. Nach 20 Minuten wurden die Hautgewebe für 5 Minuten zunächst 2x mit reinem PBS und 1x mit PBS/0,1% Glycin gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C in PBS gelagert. Die fixierten Hautmodelle wurden anschließend zum Institut für Radiobiologie der Bundeswehr (München, Deutschland) gebracht und dort weiterverarbeitet. Um die Hautmodelle aus ihren Inserts zu lösen, wurden sie durch eine 8 mm Biopsie – Stanze (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) rausgeschnitten und mitsamt ihrer Membran in Agarose eingebettet. Die Hautmodelle wurden dann mithilfe des Leica ASP300S tissue processors (Leica Biosystems, Nußloch, Germany) in einer Serie von Alkoholbädern entwässert, mit Paraffin infiltriert und nachfolgend in würfelförmigen Gießformen in Paraffin eingebettet. Die Orientierung der Mikrostrahlen

wurde dabei stets markiert, sodass die Paraffinblöcke mit einem Leica RM2255 Mikrotom in 5µm Schichten senkrecht zu den Mikrostrahlen geschnitten werden konnten.

3.2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Paraffinschnitte wurden zunächst für die Immunfluoreszenzfärbung vorbereitet. Dazu wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte auf Superfrost plus Objektträgern (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgebracht und auf einer Heizplatte bei 37°C über Nacht getrocknet. Die Schnitte wurden dann in Xylene entwacht und in einer absteigenden Serie von Alkoholbädern wieder rehydriert. Zur Antigendemaskierung wurden die Objektträger im 0,01 M Natriumcitrat-Puffer (ph = 5) für 40 Minuten in ein 95°C heißes Wasserbad gebracht und anschließend wieder langsam abgekühlt. Um unspezifische Proteinbindung zu verhindern, wurden die Objektträger 10 Minuten bei 37°C in einem von dem Institut für Radiobiologie der Bundeswehr (München, Deutschland) entwickeltem TCTG-Puffer (10mM TRIS, 5% Na-Casein, 0,1% Tween20, 0,1% Fischgelatine, ph=7,4) getaucht. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Gewebeschnitte zunächst für 1,5 Stunden bei 37°C mit Primärantikörpern gegen γ H2AX (mouse anti- γ -H2AX; Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) und 53BP1 (rabbit anti-53BP1; NB 100-304, Novus Biotechnie, Wiesbaden, Deutschland) in TCTG-Puffer inkubiert. Nachdem die Objektträger 3 mal 5 Minuten lang in TCTG gewaschen wurden, erfolgte für 1 Stunde bei 37°C die Inkubation mit den Sekundärantikörpern dk-antirabbit-Cy3 und gt-anti-mouse-Cy5 (beide Jackson laboratories, Bar Harbor, Maine, USA). Im Anschluss wurden die Objektträger 3 mal 3 Minuten in TCTG gewaschen und zur Darstellung der DNA für 2 Minuten mit 0.2 g/mL DAPI (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in PBS gegengefärbt und mit ProLong Glass Antifade (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) und einem Deckglas abgedeckt.

3.2.4 Auswertung

Die Immunfluoreszenzmikroskopie und quantitative Bildanalyse der Hautgewebe wurde freundlicherweise von dem Institut für Radiobiologie der Bundeswehr (München, Deutschland) unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops Axio Observer Z1 (Zeiss, Oberkochen, Germany), der digitalen Analyseplattform TissueFAXS und der Analyse Software TissueQuest und StrataQuest (alle von TissueGnostics, Wien, Österreich), durchgeführt. Für die Auswertung der örtlichen Auflösung der DNA-Schäden wurden den einzelnen Zellkernen eine Position

entlang des Hautgewebes annotiert. Bei gekrümmten Sektionen wurden die Zellkerne entlang des Hautgewebes relativ zu einem bestimmten Punkt am Ende des Hautgewebes abgebildet, sodass am Ende die Zellen linear in 2D dargestellt werden konnten (Scherthan et al., 2022). Die räumliche Aufteilung der DNA-Schäden und deren quantitative Analyse in den Peaks und Valleys wurden mithilfe von Matlab (Natick, MA, USA) (Code bereitgestellt von Dr. Stefan Bartzsch) analysiert. Dabei wurden die Positionen der Zellen relativ zum nächsten Mikrostrahl-Zentrum in Bins von 25 μm ausgewertet.

Für jeden Fixierungszeitpunkt und jede Bestrahlungsmodalität wurden 3 Kontrollen angelegt, 2-4 Hautmodelle bestrahlt und für jedes Hautmodell mindestens 3 Gewebeschnitte bearbeitet und analysiert.

3.2.5 Bestrahlung und physikalische Dosimetrie

Die Bestrahlung der Hautgewebe mit Mikrostrahlen erfolgte ebenfalls mithilfe des Mikrostrahl-Kollimators am XenX (siehe Kapitel 3.1.7.). Vor der Bestrahlung wurde eine Filmdosimetrie durchgeführt, unter anderem von Dr. Stefan Bartzsch, Mabroor Ahmed und Rainer Lindner. Dazu wurde gemäß der Geometrie der Hautgewebe in den Inserts ein Stück EBT3 Film zwischen einer 2 mm Platte PMMA und einer 9 mm Platte PMMA gelegt und bestrahlt. Es ergab sich eine Peak-Dosisrate von 4,1 Gy/min und eine Valley-Dosisrate von 0,112 Gy/min. Eine entsprechende Dosimetrie wurde für die Broadbeam-Bestrahlung am X-Strahl RS225 (X-Strahl LTD, Camberlay, UK) durchgeführt mit einer resultierenden Dosisrate von 7,06 Gy/min. Um möglichst genau dem Setup der Filmdosimetrie zu entsprechen und sterile Bedingungen zu gewährleisten, wurden die Hautgewebe in den Inserts für die Bestrahlung unter sterilen Bedingungen in 35 \times 10 mm Nunc™ Zellkultur-Petrischalen (ThermoFisher scientific, Massachusetts, USA) gelegt, mit PBS randvoll aufgefüllt und mit SealPlate® Film (Excel-Scientific, Victorville, CA, USA) abgeklebt. Vor der Bestrahlung wurden mit einer Kanüle (Gr. 20 Sterican, Braun, Melsungen, Deutschland) zwei Löcher jeweils gegenüber in die Hautgewebe gestochen und die Richtung der Löcher anschließend auf dem SealPlate® Film mit einem Strich markiert, um die Hautgewebe während der Bestrahlung parallel zu den Mikrostrahlen ausrichten zu können. Die Spannung am XenX betrug dabei 225 kV und der Röhrenstrom 13 mA. Dabei wurde für die Bestrahlung ein großer Fokuspunkt verwendet, eine Schlitzweite von 50 μm eingestellt und der Kupferfilter eingesetzt. Der ctc-Wert betrug 400 μm . Die Proben wurden direkt auf den Kollimator gelegt und von unten bestrahlt. Um eine

Peakdosis von 19 Gy und eine Valley Dosis von 1 Gy zu erreichen, wurde nach der Bestrahlung am XenX eine homogene Bestrahlung am X-Strahl RS225 durchgeführt. Entsprechend der Valleydosis von 1 Gy bei der Bestrahlung mit Mikrostrahlen wurde eine Referenzbestrahlung mit Broadbeam am RS225 mit 1 Gy durchgeführt. Die Spannung am RS225 betrug dabei 220 kV, der Röhrenstrom 1 mA und es wurde, wie auch am XenX, der Kupferfilter verwendet.

3.3 Statistik

Die Mittelwerte wurden berechnet und als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt. Um signifikante Unterschiede festzustellen, wurde der Student's t-test in SPSS (IBM, Ehningen, Deutschland) angewandt. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Outlier wurden mithilfe von Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) anhand des Interquartilsabstandes IQR (interquartile range) identifiziert.

4 Ergebnisse

4.1 Biologische Dosimetrie mit Mikrokernen und Brücken in Zellkultur

4.1.1 Bestimmung der Inkubationszeit für Cytochalasin B für CHO-K1-Zellen

Bestimmung der Wachstumskurve:

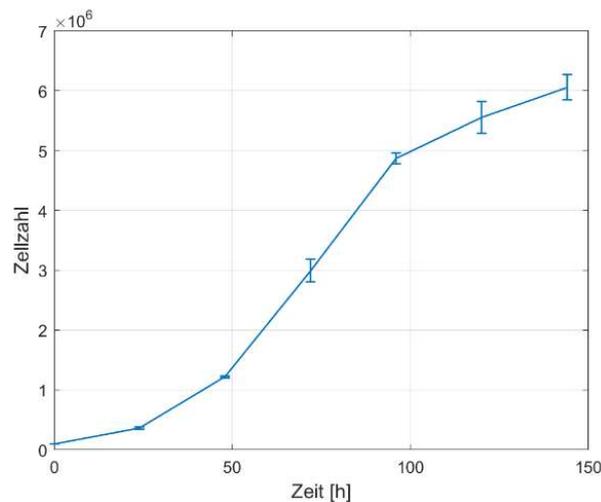


Abbildung 3: Wachstumskurve der CHO-K1-Zellen. Zu sehen sind die Zellzahl und die Kultivierungszeit in Stunden. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung dar, $N=3$.

Die Verdopplungszeit betrug für die hier verwendeten CHO-K1 Zellen $24,0 \pm 0,6$ Stunden (Abb. 3).

Bestimmung der Inkubationszeit: Basierend auf der Verdopplungszeit wurden verschiedene Zeiten für die Inkubation der Zellen mit Cytochalasin B getestet, um die größtmögliche Anzahl an binuklären Zellen (BNZ) nach Bestrahlung zu erreichen. Für die Bestimmung der Inkubationszeit wurde als Maß der Anteil der binuklären Zellen an der Gesamtzahl der Zellen (binukleäre Zellen + monokleäre Zellen (MNZ)) verwendet.

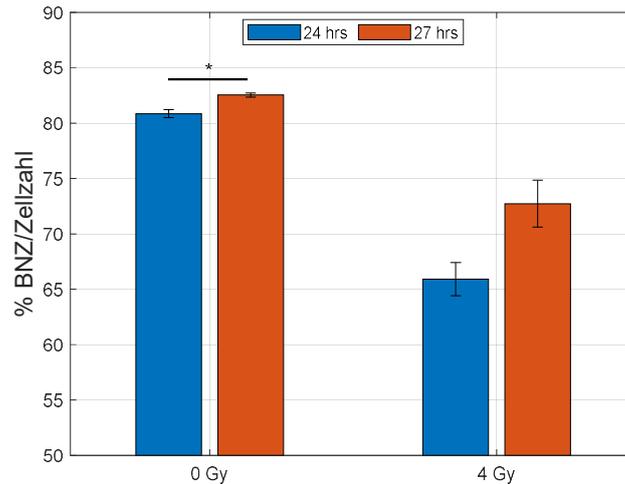


Abbildung 4: Anteil binukleärer Zellen an der Gesamtzahl der Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und Dosis. BNZ/(BNZ+MNZ) in Prozent nach 0 Gy und 4 Gy, sowie nach 24 und 27 Stunden. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert +/- Standardabweichung dar, N=2, * p-Wert <0,05.

Nach 0 Gy und 27 Stunden wurde mit 82,5 +/- 0,2% einen signifikant größeren prozentualen Anteil an BNZ erreicht als nach 24 Stunden mit 80,9 +/- 0,4% ($p < 0,05$). Auch nach 4 Gy war nach 27 Stunden ein größerer Anteil zu beobachten (73 +/- 2% nach 27 Stunden und 66 +/- 2% nach 24 Stunden), dies war jedoch nicht auf einem $p < 0,05$ Level signifikant (Abb. 4).

Da für 0 Gy bei 27 Stunden ein signifikant größeres Verhältnis von BNZ/Zellzahl zu beobachten war und bei längeren Fixierungszeiten bereits tri- und tetranukleäre Zellen unter dem Mikroskop beobachtet werden konnten, wurde der Zeitpunkt von 27 Stunden als Inkubationszeit mit Cytochalasin B für den CBMN-Assay festgelegt.

4.1.2 Binukleäre Zellen nach Broadbeam-Bestrahlung und MRT

Anteil der binukleären Zellen in Abhängigkeit von der Dosis nach Broadbeam-Bestrahlung

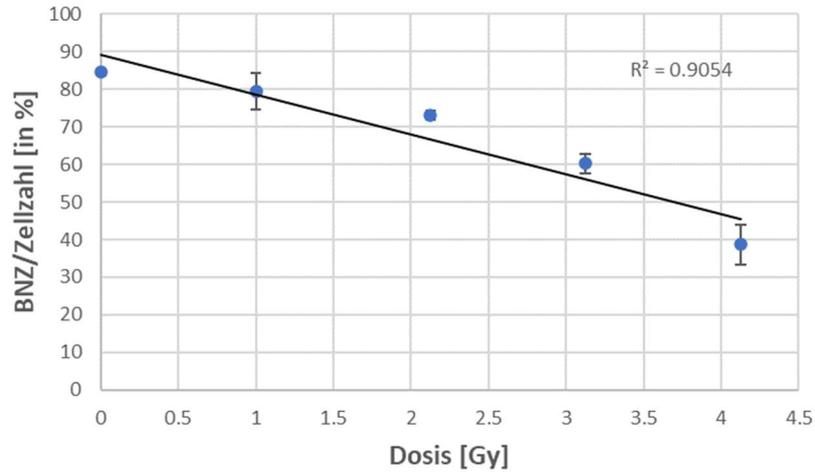


Abbildung 5: BNZ/Zellzahl [%] in Abhängigkeit von der Dosis. Zu sehen ist der Anteil an binukleären Zellen ($BNZ/(MNZ+BNZ)$) in Prozent bei 0 – 4 Gy nach einer Inkubationszeit von 27 Stunden nach Broadbeam-Bestrahlung. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung dar, $N=3$ für alle Dosen außer 3 Gy ($N=2$). Die Auswertung erfolgte über >1500 Zellen.

In Abbildung 5 ist zu erkennen, dass der Anteil an binukleären Zellen an der Gesamtzahl an Zellen mit zunehmender Dosis der Broadbeam-Bestrahlung abnimmt. Die Datenpunkte wurden linear mit einer Gleichung von $y = -11x + 89$ angepasst, der R-Quadratwert betrug 0,9054. Der Anteil binukleärer Zellen lag bei 0 Gy bei 84,5 \pm 0,7% und sank bei 4 Gy auf 39 \pm 5%.

Anzahl an BNZ in Abhängigkeit vom Abstand zum Peak nach MRT

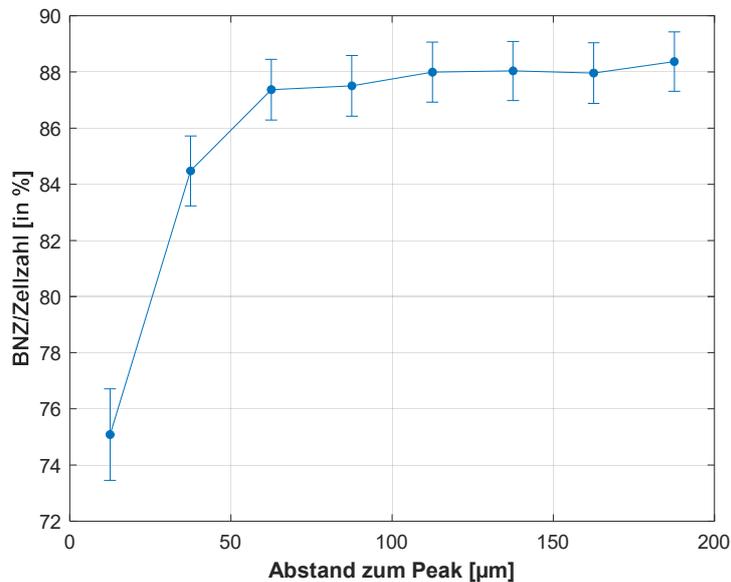


Abbildung 6: BNZ/Zellzahl [%] nach MRT in Abhängigkeit vom Abstand zum Peak. Zu sehen ist der Anteil an binucleären Zellen an der Gesamtzahl der Zellen ($BNZ/(MNZ+BNZ)$) nach MRT in Abhängigkeit vom Abstand zum Peak, einer Inkubationszeit von 27 Stunden, einer Peakdosis von 2Gy und einer PVDR von 40,67. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert +/- Standardabweichung dar, Bingröße = 25µm, N=3.

Auch nach Bestrahlung mit Mikrostrahlen war eine Dosisabhängigkeit für die Entstehung binucleärer Zellen zu erkennen. Mit zunehmendem Abstand zum Peak und mit einer abnehmenden Dosis von 2 Gy im Peak bis auf eine Dosis von 0,05 Gy im Valley, erkannte man eine Zunahme an binucleären Zellen. Im Peak betrug der mittlere Anteil an BNZ 75 +/- 2%, im Valley stieg der Anteil auf 88 +/- 1% an ($p < 0,01$) (Abb. 6).

4.1.3 Referenzkurven für die biologische Dosimetrie

Um die biologische Dosis anhand von Mikrokernen und Brücken als Biodosimeter berechnen zu können, wurde zunächst jeweils eine Referenzkurve unter denselben Bestrahlungsbedingungen etabliert.

Mikrokern in binukleären Zellen:

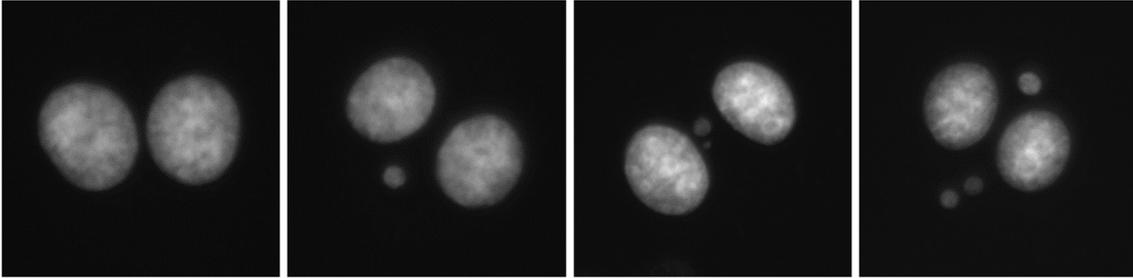


Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopie-Bild von Mikrokernen in binukleären Zellen. Binukleäre CHO-K1 Zellen mit Mikrokernen, angefärbt mit Hoechst, 40-fache Vergrößerung. Von links nach rechts: BNZ ohne Mikrokern, BNZ mit einem Mikrokern, BNZ mit zwei Mikrokernen, BNZ mit drei Mikrokernen.

Referenzkurve für Mikrokern:

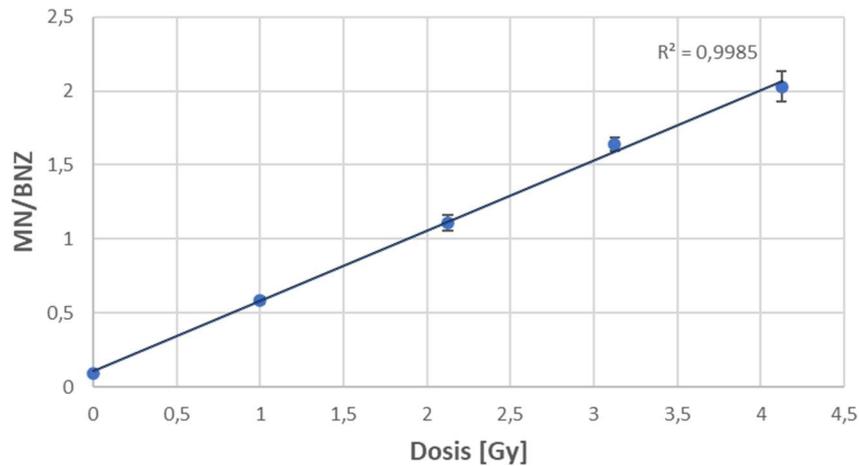


Abbildung 8: Referenzkurve für Mikrokern in Abhängigkeit von der Dosis. Abgebildet ist die durchschnittliche Anzahl an Mikrokernen MN pro binukleärer Zelle BNZ (MN/BNZ) für 0 – 4 Gy nach Broadbeam-Bestrahlung. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert +/- Standardabweichung dar, N=3 für alle Dosen außer 3 Gy (N=2), die Auswertung erfolgte über > 1500 Zellen.

Nach Durchführung des CBMN-Assays war die Entstehung von Mikrokernen in binukleären Zellen zu erkennen (Abb. 7). Die Referenzkurve für Mikrokern e ergab eine lineare Abhängigkeit des Verhältnisses MN/BNZ von der Dosis, wobei die mittlere Anzahl an Mikrokernen pro binukleärer Zelle mit zunehmender Dosis anstieg. Die Datenpunkte wurden mit einer linearen Trendlinie mit der Gleichung $y=0,47x+0.11$ angepasst. Der R-Quadratwert betrug 0,9985. Für eine Dosis von 0 Gy lag die mittlere Anzahl an MN pro BNZ bei $0,094 \pm 0,009$ und für 4 Gy bei $2,029 \pm 0,100$ (Abb. 8).

Brücken (NPB nucleoplasmic bridges) in binukleären Zellen:

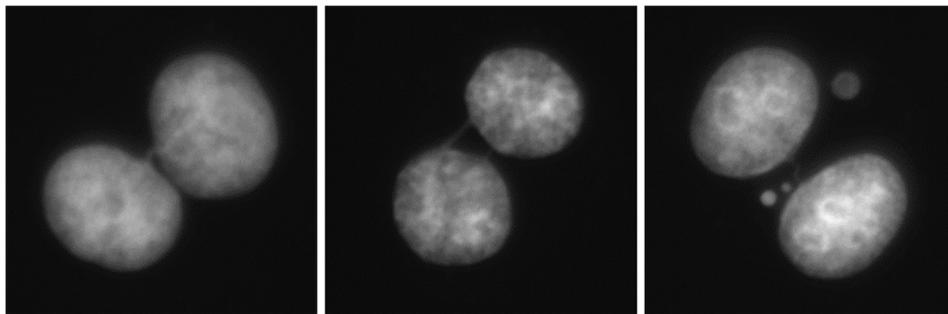


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopie-Bild von Brücken in binukleären Zellen. Binukleäre Zellen (CHO-K1) mit Brücken, angefärbt mit Hoechst, 40-fache Vergrößerung. Von links nach rechts: BNZ mit einer Brücke, BNZ mit zwei Brücken, BNZ mit einer Brücke und 3 Mikrokernen.

Referenzkurve für Brücken:

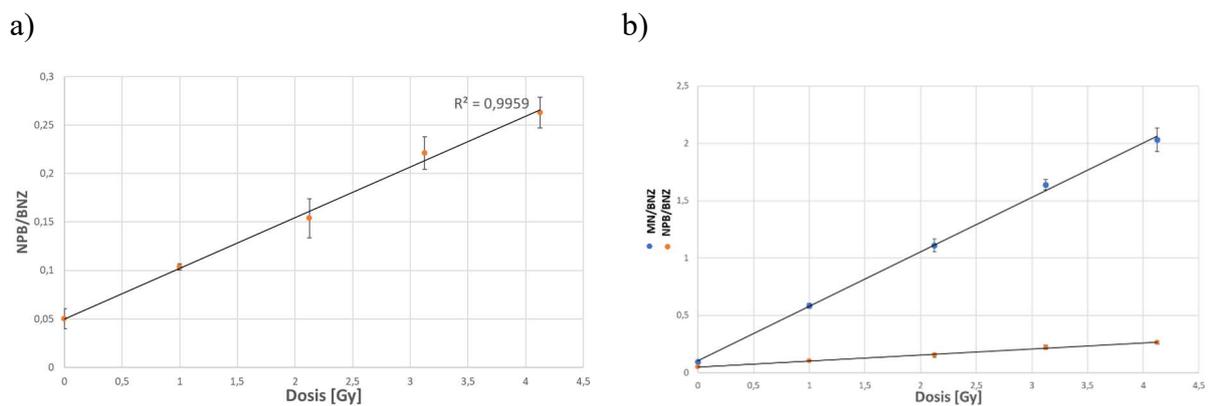


Abbildung 10: Referenzkurve für NPB in Abhängigkeit von der Dosis. a) Abgebildet ist die durchschnittliche Anzahl an NPB pro binukleärer Zelle BNZ (NPB/BNZ) für 0 – 4 Gy nach Broadbeam-Bestrahlung. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung dar, $N=3$ für alle Dosen außer 3 Gy ($N=2$), die Auswertung erfolgte über > 1500 Zellen. b) Vergleich zwischen der Referenzkurve für Mikrokern e (blau) und der Referenzkurve für Brücken (orange).

Nach Durchführung des CBMN-Assays waren neben Mikrokernen auch nukleoplasmatische Brücken zu sehen (Abb. 9). Die Referenzkurve für Brücken ergab eine lineare Abhängigkeit des Verhältnisses NPB/BNZ von der Dosis. Mit zunehmender Dosis nahm auch die Anzahl der Brücken zu. Die Datenpunkte wurden mit einer linearen Trendlinie mit der Gleichung $y = 0,052x + 0,050$ angepasst. Der R-Quadratwert betrug 0,9959. Die Steigung der Geraden für Brücken war um ca. ein 10-faches kleiner als die Steigung der Geraden für Mikrokern. Für eine Dosis von 0 Gy lag die mittlere Anzahl an NPB pro BNZ bei $0,05 \pm 0,01$ und für 4 Gy bei $0,26 \pm 0,02$ (Abb. 10).

4.1.4 Biologische Dosimetrie in situ für MRT

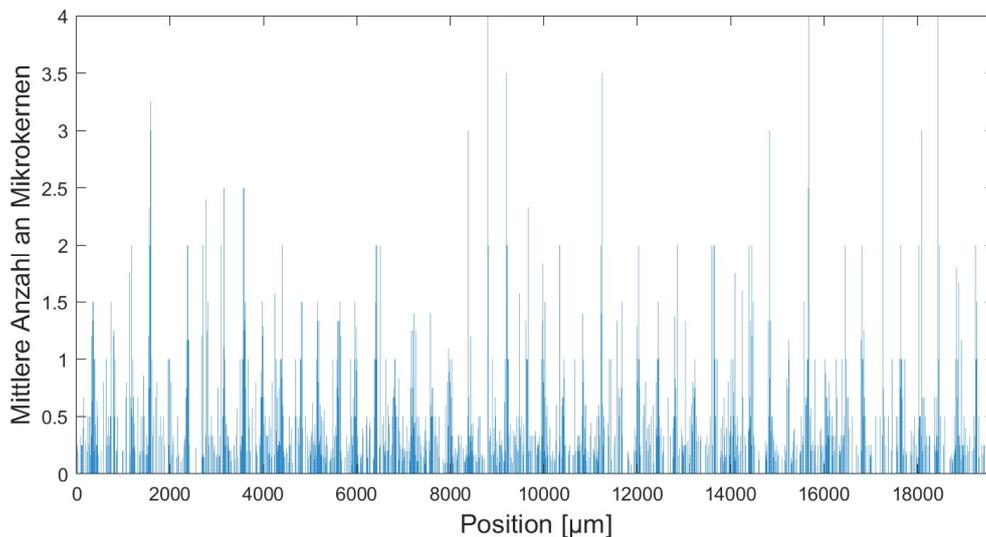


Abbildung 11: Mittlere Anzahl an Mikrokernen entlang der x-Achse. Die mittlere Anzahl an Mikrokernen pro binukleärer Zelle gemittelt in Bins von 10 µm entlang der x-Achse.

Nach der Bestrahlung mit MRT war entsprechend der Peaks der Mikrostrahlen in regelmäßigen Abständen entlang der x-Achse der Koordinaten der bestrahlten Zellen distinktive Anhäufungen von Mikrokernen zu sehen, wobei ein scharfer Abfall in den Valleys zu erkennen war (Abb. 11).

Für die Bestimmung der absorbierten Dosis nach MRT wurde mithilfe von Matlab die mittlere Anzahl der Mikrokern pro BNZ und die mittlere Anzahl der Brücken pro BNZ in Abhängigkeit vom Abstand zum Peak berechnet und anhand der Referenzkurven in die jeweilige biologische Dosis umgewandelt.

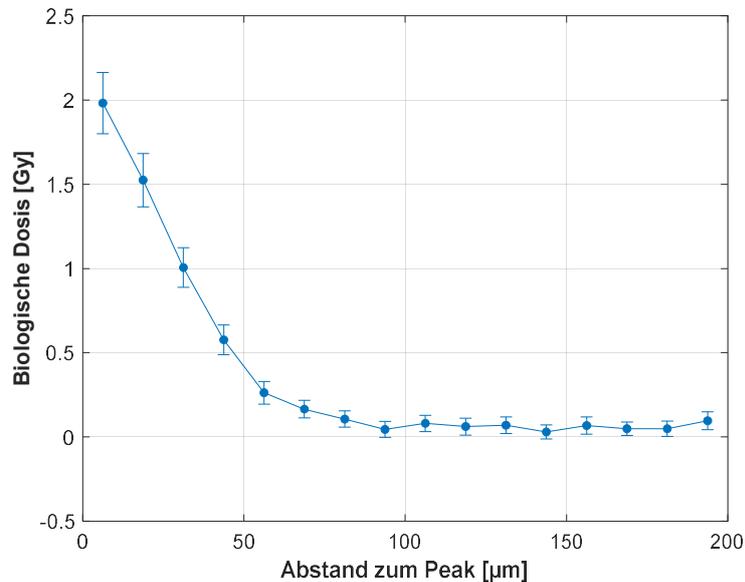
Dosimetrie mit Mikrokernen nach MRT mit einer Peakdosis von 2 Gy

Abbildung 12: Dosimetrie mit Mikrokernen nach MRT mit einer Peakdosis von 2 Gy. Abgebildet ist die biologische Dosis in Abhängigkeit vom Abstand zum Peakzentrum nach Bestrahlung mit Mikrostrahlen. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Peakdosis von 2 Gy und einer PVDR von 40,67. Dabei wurden Zellen relativ zum nächsten Peakzentrum in Bins von 12,5µm über den gesamten Objektträger gescored. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert +/- Standardabweichung dar, >1100 Zellen pro Datenpunkt wurden ausgewertet, N=3.

Für die Bestrahlung mit Mikrostrahlen mit einer Peakdosis von 2 Gy und einer Valleydosis von 0,05 Gy ergab die biologische Dosimetrie mit Mikrokernen eine biologische Dosis von 1,98 +/- 0,18 Gy (1,05 +/- 0,09 MN/BNZ) im Peak und eine biologische Dosis von 0,10 +/- 0,05 Gy (0,15 +/- 0,03 MN/BNZ) im Valley. Es waren zwischen der physikalischen Dosimetrie mit Gafchrom-Film und biologischer Dosimetrie mit Mikrokernen keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Die Peakbreite bei halbem Maximum (FWHM *full width at half maximum*) betrug ungefähr 60 µm. Der Abstand zwischen den Peaks betrug 402,3 +/- 0,1 µm (Abb. 12).

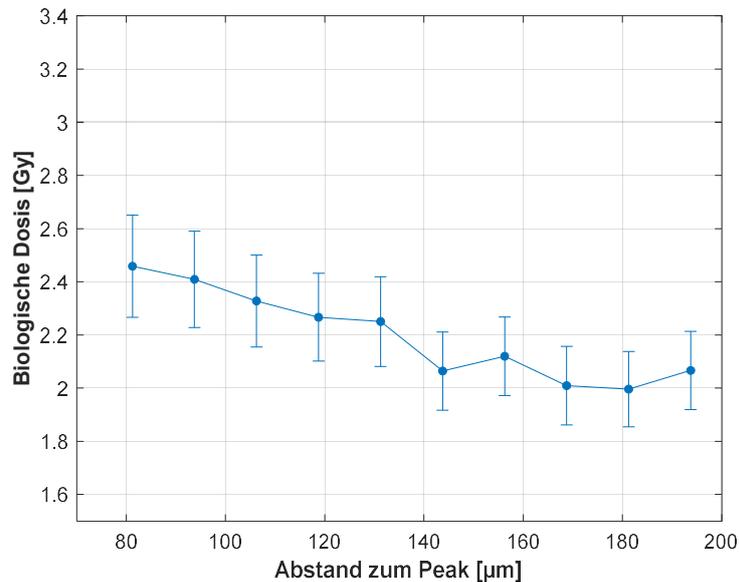
Dosimetrie mit Mikrokernen nach MRT mit einer Valleydosis von 2 Gy

Abbildung 13: Dosimetrie der Valleyregion mit Mikrokernen nach MRT mit einer Valleydosis von 2 Gy.

Abgebildet ist die biologische Dosis der Valleyregion in Abhängigkeit vom Abstand zum Peakzentrum nach MRT. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Valleydosis von 2 Gy und einer PVDR von 40,67. Dabei wurden Zellen relativ zum nächsten Peakzentrum in Bins von $12,5\mu\text{m}$ über den gesamten Objektträger gescored. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung dar, >1000 Zellen pro Datenpunkt wurden ausgewertet, $N=3$.

Für die Bestrahlung mit Mikrostrahlen mit einer Valleydosis von 2 Gy und einer Peakdosis von $81,34$ Gy ergab die Dosimetrie mit Mikrokernen eine biologische Dosis von $2,07 \pm 0,15$ Gy ($1,09 \pm 0,07$ MN/BNZ) im Mittelpunkt der Valleys (im Abstand von $194 \mu\text{m}$ zum Peakzentrum). Aufgrund der hohen Dosis war eine Dosimetrie mit Mikrokernen im Peak und bis zu $81 \mu\text{m}$ relativ zum Peakzentrum nicht möglich (Kapitel 5.1). Für die Valleydosis waren zwischen der physikalischen Dosimetrie mit Gafchrom-Film und biologischer Dosimetrie mit Mikrokernen keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Der Abstand zwischen den Peaks betrug $402,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (Abb. 13).

Vergleich der Dosimetrie der Valleyregion zwischen MRT mit einer Peak- und Valleydosis von 2 Gy

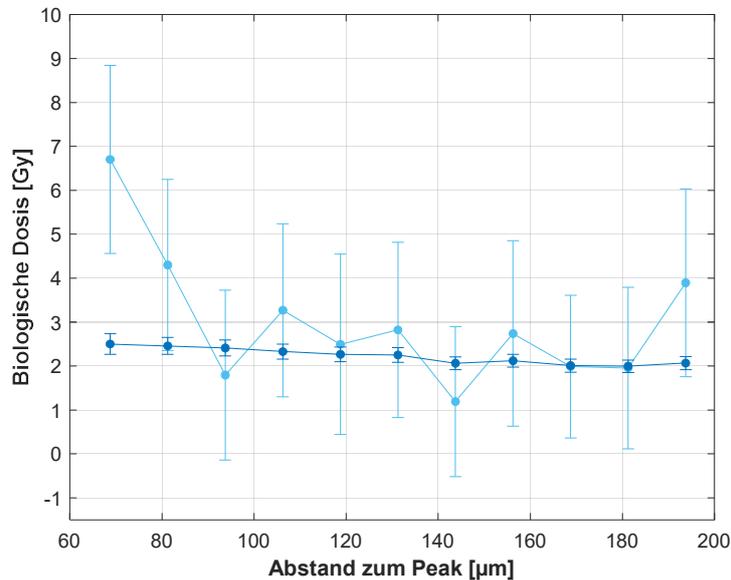


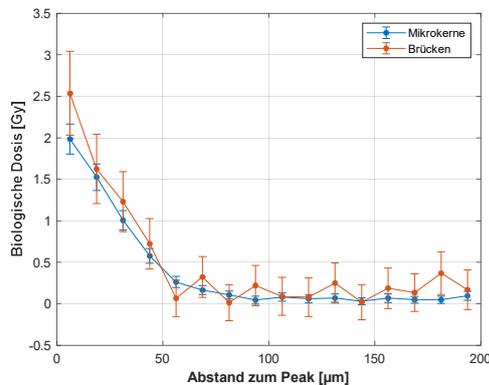
Abbildung 14: Vergleich der Dosimetrie für den Valleyabschnitt zwischen MRT mit einer Peak- und Valleydosis von 2 Gy. Abgebildet ist die Dosimetrie für den Abschnitt $69\mu\text{m} - 200\mu\text{m}$ relativ zum Peakzentrum. In hellblau ist die Dosimetrie für die Bestrahlung mit einer Peakdosis von 2 Gy abgebildet (um $PVDR=40,67$ skaliert, vgl. Abb. 12) und in dunkelblau die Dosimetrie für die Bestrahlung mit einer Valleydosis von 2 Gy (vgl. Abb. 13). Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung dar, $N=3$.

Da die Valleydosis eine wichtige Rolle für die Bestrahlung mit Mikrostrahlen darstellt (Smyth et al., 2016), wurde hier die Dosimetrie für die Valleyregion näher untersucht. Es wurde die Dosimetrie mit einer Valleydosis von 2 Gy (vgl. Abb. 13) mit der Dosimetrie mit einer Peakdosis von 2 Gy (vgl. Abb. 12) verglichen. Dazu wurde die Dosimetrie für die Bestrahlung mit einer Peakdosis von 2 Gy um $40,67 (=PVDR)$ skaliert und dem Graphen für die Dosimetrie mit einer Valleydosis von 2 Gy gegenübergestellt.

Zu erkennen war, dass für eine Dosimetrie der Valleyregion eine Dosimetrie mit einer Bestrahlung von 2 Gy im Valley genauer war als eine Dosimetrie mit einer Bestrahlung von 2 Gy im Peak ($0,05$ Gy im Valley). Durch die Gegenüberstellung war es zudem möglich abzuschätzen, bis zu welchem Bereich die Dosimetrie noch auswertbar war. Es war zu sehen, dass die Dosimetrie mit einer Valleydosis von 2 Gy bis zu einer Distanz von weniger als $81\mu\text{m}$ zum Peakzentrum stark von der Dosimetrie mit einer Peakdosis von 2 Gy divergierte (Abb. 14).

Dosimetrie mit Brücken für Peak und Valley nach MRT:

a)



b)

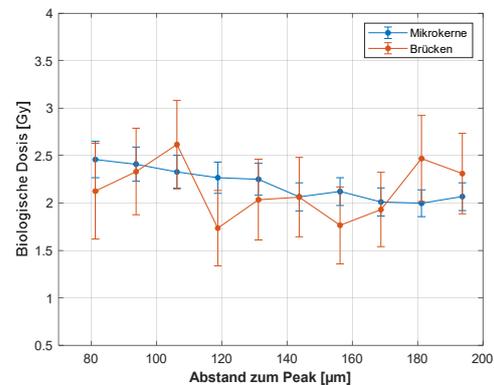


Abbildung 15: Dosimetrie mit NPB nach MRT mit einer Peak- und Valleydosis von 2 Gy.

In orange ist die biologische Dosis gemessen anhand von NPB in Abhängigkeit vom Abstand zum Peakzentrum nach MRT abgebildet (Im Vergleich dazu die Dosimetrie mit Mikrokerneln in blau). Die Bestrahlung erfolgte mit einer Peakdosis von 2 Gy (a) und einer Valleydosis von 2 Gy (b). Dabei wurden Zellen relativ zum nächsten Peakzentrum in Bins von 12,5µm gescored. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert +/- Standardabweichung dar, >1000 Zellen pro Datenpunkt wurden ausgewertet, N=3.

Für die Bestrahlung mit Mikrostrahlen bei einer Peakdosis von 2 Gy und einer Valleydosis von 0,05 Gy ergab die Dosimetrie mit Brücken eine biologische Dosis von 2,53 +/- 0,51 Gy (0,18 +/- 0,03 NPB/BNZ) im Peak und eine Dosis von 0,17 +/- 0,24 Gy (0,06 +/- 0,01 NPB/BNZ) im Valley. Für die Bestrahlung mit einer Valleydosis von 2 Gy und einer Peakdosis von 81,34 Gy ergab die Dosimetrie mit Brücken eine biologische Dosis von 2,31 +/- 0,42 Gy (0,17 +/- 0,02 NPB/BNZ) im Valley. Aufgrund der hohen Dosis war eine Dosimetrie mit Brücken im Peak und bis zu 81 µm relativ zum Peakzentrum nicht möglich (Kapitel 5.1). Die Dosimetrie mit Brücken wies keine signifikanten Unterschiede zur Dosimetrie mit Mikrokerneln auf (Abb. 15).

Für MRT mit einer Peakdosis von 2 Gy wurden im Peak bei 53,9 +/- 5,5% aller binukleären Zellen Mikrokerne und bei 18,0 +/- 5,8% aller binukleären Zellen Brücken beobachtet. Es wiesen insgesamt 72,8 +/- 4,1% der Zellen mit NPB auch MN auf, wobei 24,1 +/- 6,3 % der Zellen mit MN auch NPB zeigten. Bei 13,2 +/- 4,9% der Zellen waren sowohl NPB als auch MN zu erkennen. Für MRT mit einer Valleydosis von 2 Gy wurden im Valley bei 59,1 +/- 4% aller binukleären Zellen Mikrokerne und bei 15,8 +/- 2,6% aller binukleären Zellen Brücken beobachtet. Es wiesen insgesamt 84,2 +/- 6,8% der Zellen mit NPB auch MN auf, wobei 22,3 +/- 1,4% der Zellen mit MN auch NPB zeigten. Bei 13,2 +/- 1,0% der Zellen waren sowohl NPB als auch MN zu erkennen. Zwischen den Werten für die Peaks nach MRT mit einer Peakdosis von 2 Gy und den Werten für die Valleys nach MRT mit einer Valleydosis von 2 Gy waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

4.2 MRT mit rekonstruiertem Hautgewebe

Die CBMN-Methode ist wie bereits beschrieben eine einfache und genaue Methode, um die biologische Dosis für Mikrostrahlen zu messen. Da bei dieser Methode jedoch der dreidimensionale Aufbau von Gewebe und die entsprechenden Zellkontakte fehlen (Antoni et al., 2015), ist für den Nachweis und die Quantifizierung von Bystander-Effekten eine realitätsgetreuere Abbildung nötig. Um dies zu realisieren, wurde das Hautgewebe EpiCS mit Mikrostrahlen bestrahlt und daraufhin die DNA-Schäden der Hautgewebe anhand γ H2AX- und 53BP1-Foci untersucht. Um mögliche Bystander-Effekte zu detektieren, wurde dann die Anzahl der Foci in der Valleyregion nach MRT mit der Anzahl der Foci nach Broadbeam-Bestrahlung derselben Dosis verglichen.

Für die Auswertung der DNA-Schäden wurden für die jeweiligen Foci zum einen die mittlere Anzahl an Foci pro Zelle (*fpc foci per cell*) und zum anderen der prozentuale Anteil von Zellen mit Foci an der Gesamtheit aller Zellen (*%cwf cells with foci*) ausgewertet.

4.2.1 DNA-Schäden im zeitlichen Verlauf 0,5 h und 24 h nach MRT

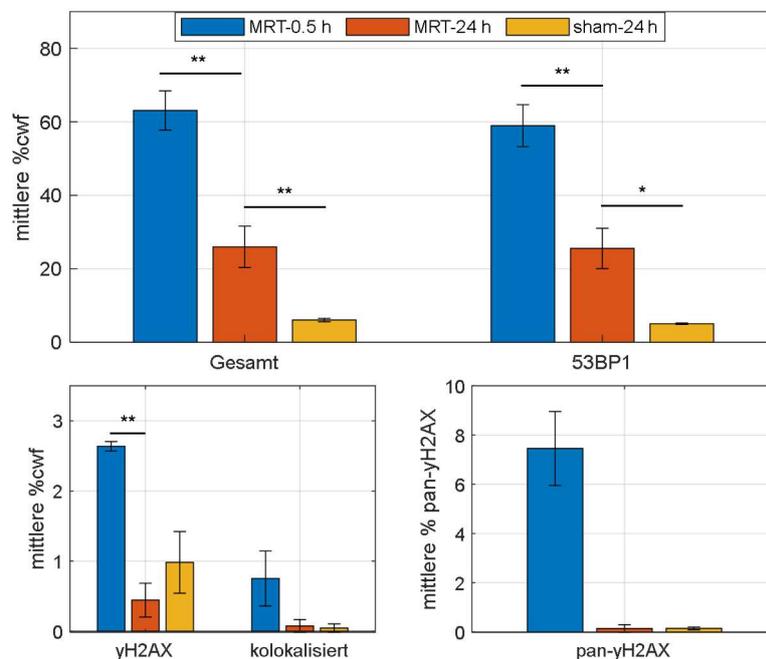


Abbildung 16: DNA-Schäden im Verlauf 0,5 h und 24 h nach MRT. Dargestellt ist der Anteil an Zellen mit Foci (Gesamt, 53BP1, γ H2AX, kolokalisiert) und der Anteil an pan- γ H2AX positiven Zellen jeweils 0,5 h (blau) und 24 h (rot) nach Bestrahlung mit Mikrostrahlen. Kontrollen nach 24 h sind in orange dargestellt. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert \pm Standardabweichung. (N=6 bei 2 unabhängigen Hautmodellen für MRT-0,5 h und N=8 bei 3 unabhängigen Hautmodellen für MRT-24 h. * p-Wert < 0,05, ** p-Wert < 0,01.

Um zu prüfen, inwieweit eine Untersuchung des Gewebes auf Bystander-Effekte nach MRT im vorliegenden Gewebe möglich ist, wurde zunächst die räumliche Verteilung der DNA-Schäden und ihr zeitlicher Verlauf ausgewertet. Als erstes wurden die DNA-Schäden über das gesamte Hautgewebe betrachtet und der zeitliche Verlauf der DNA-Schäden untersucht (Abb. 16, Tabelle 1). Der Gesamtanteil an Zellen mit Foci wurde hier berechnet aus der Summe aller Zellen mit 53BP1-, γ H2AX-, kolokalisierenden 53BP1 + γ H2AX Foci oder pan- γ H2AX Signal. Über das gesamte Hautgewebe betrachtet fiel der mittlere prozentuale Anteil von 63,1 +/- 5,4% bei 0,5 h auf 26,0 +/- 5,6% nach 24 h.

Einzel betrachtet überwog der mittlere prozentuale Anteil an Zellen mit 53BP1-Foci mit 59,0 +/- 5,7% nach 0,5 h und sank auf 25,5 +/- 5,5% nach 24 Stunden. Nach 24 Stunden war der Anteil an Zellen mit 53BP1-Foci im Vergleich zu Sham-bestrahlten Hautmodellen nach 24 h (5,05 +/- 0,20%) noch signifikant erhöht ($p < 0,01$). Die mittlere Anzahl an Foci pro Zelle sank dabei von 1,9 +/- 0,3 fpc auf 0,4 +/- 0,1 fpc.

Der mittlere Anteil an Zellen mit γ H2AX-Foci betrug 0,5 h nach Bestrahlung 2,64 +/- 0,07% und war signifikant ($p < 0,01$) höher als nach 24 Stunden (0,44 +/- 0,24%). Nach 24 h entsprach der Anteil dem Anteil im Sham-bestrahlten Hautgewebe nach 24 h (0,98 +/- 0,44%). Die mittlere Anzahl an Foci pro Zelle sank dabei von 0,034 +/- 0,002 fpc auf 0,005 +/- 0,003 fpc.

Der mittlere Anteil an Zellen mit kolokalisierten Foci war nach 0,5 Stunden mit 0,75 +/- 0,4% zwar höher als 0,07 +/- 0,09% nach 24 Stunden, jedoch bestand hier keine Signifikanz (Sham nach 24 h im Vergleich: 0,05 +/- 0,06%)

Auch der mittlere Anteil an Zellen mit pan- γ H2AX war 0,5 Stunden nach MRT mit 7,5 +/- 1,5% höher als nach 24 Stunden mit 0,14 +/- 0,16% bei 24 Stunden, jedoch bestand auch hier keine Signifikanz (Sham nach 24 h im Vergleich: 0,15 +/- 0,06).

Insgesamt war zu erkennen, dass Zellen mit 53BP1-Foci überwiegen. Die Werte für %cwf sowohl für 53BP1-Foci als auch für γ H2AX-Foci stiegen 0,5 h nach MRT signifikant an, wobei ein signifikantes Abnehmen der Werte nach 24 h zu beobachten war. 24 h nach MRT lag %cwf für 53BP1-Foci dabei noch signifikant über dem Sham-Niveau, der Wert für γ H2AX-Foci entsprach nach 24 h wieder Sham-Levels. Auch pan- γ H2AX positive Zellen nahmen 0,5 h nach MRT zu und erreichten nach 24 h wieder Sham-Niveau, beides jedoch nicht auf signifikantem Niveau.

Übersicht über DNA-Schäden nach 0,5 und 24 Stunden für MRT und Broadbeam

Zeit	MRT Peak: 19Gy Valley: 1Gy	Broadbeam Dosis: 1Gy	Kontrolle
	Gesamt %		
0,5 h	63,1 +/- 5,4	54,8 +/- 3,4	5,4 +/- 1,1
24 h	26,0 +/- 5,6	25,2 +/- 0,9	6,1 +/- 0,5
	pan-γH2AX %		
0,5 h	7,46 +/- 1,50	0,13 +/- 0,10	0,04 +/- 0,02
24 h	0,14 +/- 0,16	0,15 +/- 0,25	0,15 +/- 0,06
	53BP1		
	%cwf		
0,5 h	59,0 +/- 5,7	54,0 +/- 3,8	5,06 +/- 1,18
24 h	25,5 +/- 5,5	24,3 +/- 1,4	5,05 +/- 0,20
	fpc		
0,5 h	1,92 +/- 0,27	1,45 +/- 0,17	0,07 +/- 0,01
24 h	0,41 +/- 0,11	0,31 +/- 0,02	0,08 +/- 0,02
	γH2AX		
	%cwf		
0,5 h	2,64 +/- 0,07	1,35 +/- 0,89	0,39 +/- 0,08
24 h	0,44 +/- 0,24	1,00 +/- 0,61	0,98 +/- 0,44
	fpc		
0,5 h	0,034 +/- 0,002	0,02 +/- 0,01	0,004 +/- 0,001
24 h	0,005 +/- 0,003	0,013 +/- 0,009	0,012 +/- 0,007
	kolokalisiert		
	%cwf		
0,5 h	0,75 +/- 0,39	0,3 +/- 0,31	0,017 +/- 0,014
24 h	0,07 +/- 0,09	0,11 +/- 0,07	0,046 +/- 0,060
	fpc		
0,5 h	0,009 +/- 0,005	0,003 +/- 0,003	0,0002 +/- 0,0002
24 h	0,0008 +/- 0,0011	0,0012 +/- 0,0008	0,0006 +/- 0,0008

Tabelle 1: Übersicht der DNA-Schäden für MRT, Broadbeam-Bestrahlung und Kontrollen.

Übersicht über %cwf und fpc der DNA-Schäden über das gesamte Hautgewebe nach MRT mit 19 Gy Peakdosis und 1 Gy Valleydosis, Broadbeam von 1 Gy und DNA-Schäden in den Kontrollen, jeweils 0,5 h und 24 h nach Bestrahlung. (Gesamt % als Anteil aller Zellen mit 53BP1-, γ H2AX-, kolokalisierenden 53BP1+ γ H2AX-Foci oder pan- γ H2AX Signal an allen Zellen, pan- γ H2AX% als Anteil aller pan- γ H2AX positiven Zellen an allen Zellen)

4.2.2 Räumliche Aufteilung der DNA-Schäden nach MRT

Übersicht über die räumliche Aufteilung der DNA-Schäden nach MRT

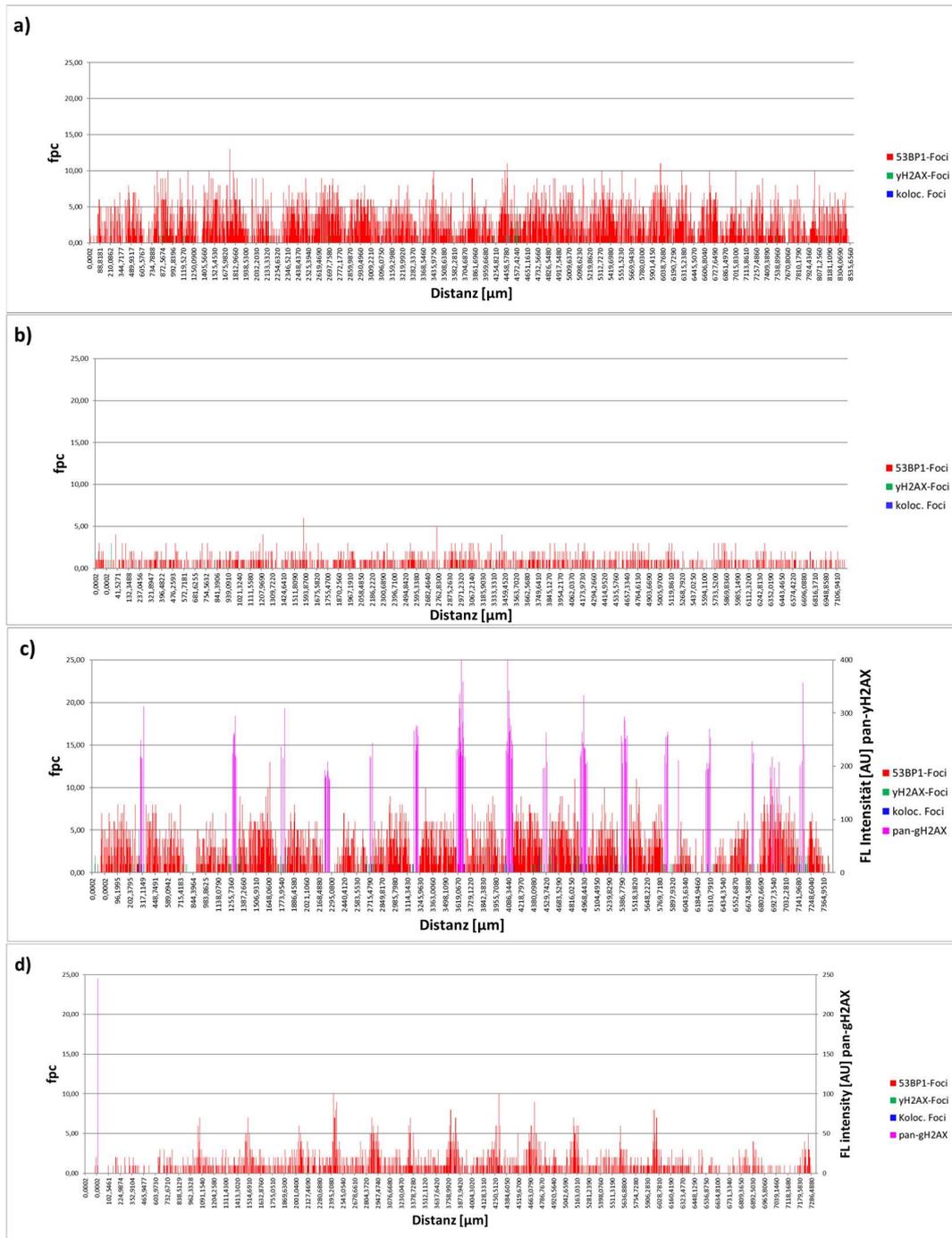


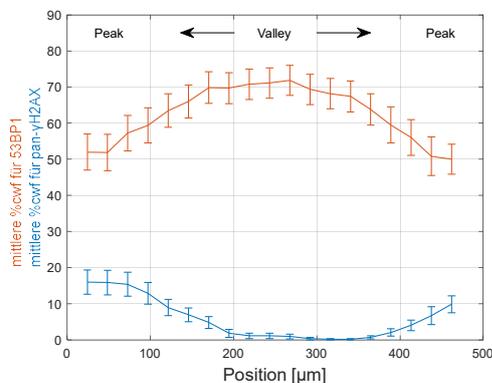
Abbildung 17: Räumliche Aufteilung der DNA-Schäden für Broadbeam-Bestrahlung und MRT nach 0,5 h und 24 h, dargestellt über den ganzen Hautgewebsschnitt. Die Positionen der Zellen werden mit den entsprechenden Foci als rote (53BP1), grüne (γ H2AX), blaue (kolokalisierte Foci) Balken und pan- γ H2AX-Signal als rosa Balken entlang des Hautgewebsschnittes dargestellt. Die Höhe der Balken entspricht der Anzahl der Foci (53BP1, γ H2AX, kolokalisierte Foci) bzw der Intensität der Fluoreszenz (arbitrary intensity units AU) für pan- γ H2AX. Hautgewebe nach Broadbeam- Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy nach 0,5 h (a) und 24 h (b). Hautgewebe nach Bestrahlung mit Mikrostrahlen bei einer Peakdosis von 19 Gy und einer Valleydosis von 1 Gy nach 0,5 h (c) und nach 24 h (d).

Als nächstes wurde die räumliche Aufteilung der DNA-Schäden analysiert, wobei die Werte für %cwf und fpc getrennt für die Peaks und Valleys untersucht wurden.

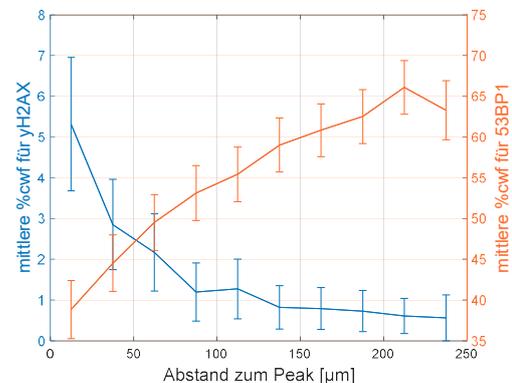
Räumliche Aufteilung der DNA-Schäden 0,5 h nach Bestrahlung mit Mikrostrahlen

Zwischen den Peaks bestand über alle Hautgewebe gemittelt etwa ein Abstand von $430 \pm 41 \mu\text{m}$. 0,5 Stunden nach MRT mit einer Dosis von 19 Gy im Peak und 1 Gy im Valley befanden sich entsprechend der Mikrostrahl-Geometrie an Stelle der Peaks gebündelte pan- γH2AX positive Zellen, welche in Richtung der Valleys abnahmen (Abb. 17c, Abb. 18a). Zellen, die γH2AX -Foci aufwiesen, waren ebenfalls überwiegend in den Peaks zu erkennen (Abb. 18b). Im Gegensatz dazu waren Zellen mit 53BP1-Foci vor allem in den Valleys zu erkennen, wobei die Anzahl an Zellen mit 53BP1-Foci in Richtung der Peaks abnahm (Abb. 18a,b). Dabei betrug der mittlere Anteil an Zellen mit 53BP1-Foci über alle Hautgewebsschnitte gemittelt $66,7 \pm 2,9$ %cwf in den Valleys und $42,2 \pm 9,3\%$ in den Peaks. Ebenso erkannte man eine Abnahme der fpc für 53BP1 in Richtung Peak (Abb. 18c), wobei die fpc über alle Hautgewebsschnitte gemittelt in den Valleys $2,28 \pm 0,25$ und in den Peaks $1,22 \pm 0,32$ betrug. (N=6 bei 2 unabhängigen Hautmodellen)

a)



b)



c)

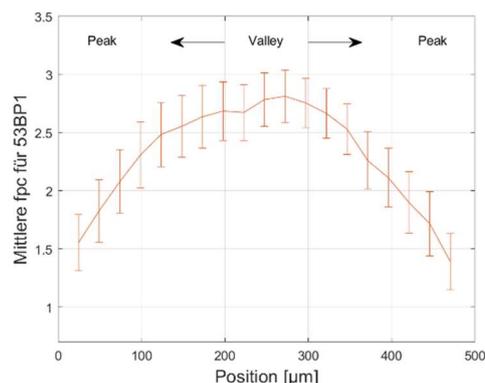


Abbildung 18: Räumliche Aufteilung der DNA-Schäden im Vergleich 0,5 h nach MRT. a) Dargestellt ist die Valleyregion mit dem mittleren prozentualen Anteil an Zellen (%cwf) mit 53BP1-Foci und dem mittleren prozentualen Anteil an pan- γ H2AX positiven Zellen entlang einer Periode (Peak-Peak). b) Prozentualer Anteil an Zellen mit γ H2AX-Foci in Prozent (blau) und 53BP1-Foci (orange) mit zunehmendem Abstand zum Peak. c) Valleyregion mit der mittleren Anzahl (fpc) an 53BP1-Foci pro Zelle entlang einer Periode (Peak-Peak). Für a) - c) gilt: Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert +/- Standardabweichung über alle Perioden eines Hautmodellschnittes. Dabei wurden die Werte relativ zum nächsten Peak in Bins von 25 μ m ausgewertet.

Räumliche Aufteilung der DNA-Schäden 24 h nach Bestrahlung mit Mikrostrahlen

Nach 24 Stunden waren in regelmäßigen Abständen an Stelle der gebündelten pan- γ H2AX positiven Zellen eine Anhäufung von 53BP1 – Foci entsprechend der Mikrostrahl-Geometrie zu erkennen. Pan- γ H2AX positive Zellen waren nur noch vereinzelt vorhanden und entsprachen der Anzahl in Sham-bestrahlten Hautmodellen (Abb. 17d). Vereinzelte γ H2AX-Foci waren hier überwiegend in den Peaks zu finden. Die Analyse der 53BP1-Foci-Verteilung 24 h nach MRT ergab ein Maximum an 53BP1-Foci in den Peaks mit einer Abnahme der Foci zum Valley hin (Abb. 19). Dabei betrug der mittlere Anteil an Zellen mit 53BP1-Foci in den Valleys 22,7 +/- 4,2 % und in den Peaks 30% +/- 7 %. Im Valley wurde eine mittlere Anzahl an 53BP1-Foci von 0,29 +/- 0,07 fpc und im Peak eine mittlere Anzahl von 0,62 +/- 0,19 berechnet. (N=8 bei 3 unabhängigen Hautmodellen)

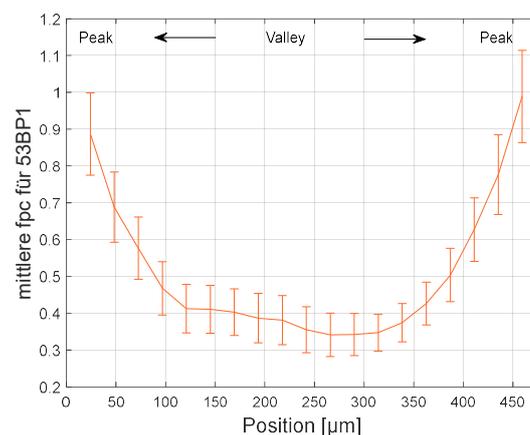


Abbildung 19: Räumliche Aufteilung der 53BP1-Foci 24 h nach MRT. Dargestellt ist die Valleyregion mit der mittleren Anzahl an 53BP1-Foci pro Zelle entlang einer Periode (Peak-Peak). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert +/- Standardabweichung über alle Perioden eines Hautmodellschnittes. Dabei wurde die Anzahl der Foci pro Zelle relativ zum nächsten Peak in Bins von 25 μ m ausgewertet.

4.2.3 Untersuchung der Valleyregion auf mögliche Bystander-Effekte

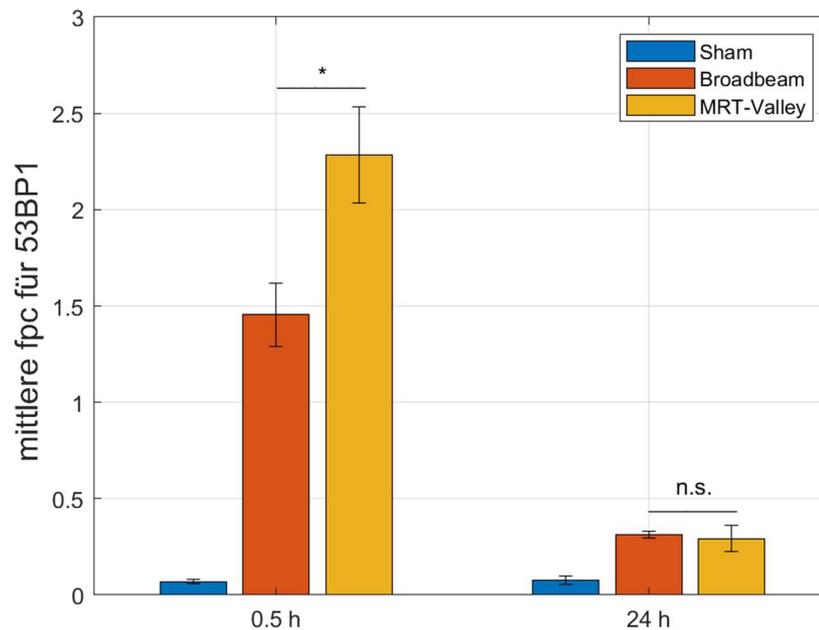


Abbildung 20: Vergleich der 53BP1 – Foci der Valleyregion nach MRT und Broadbeam-Bestrahlung.

Dargestellt ist die Anzahl der 53BP1-Foci pro Zelle nach Bestrahlung mit sham (blau), 1 Gy Broadbeam (rot) und Mikrostrahlen mit einer Valleydosis von 1 Gy und Peakdosis von 19 Gy (orange) jeweils 0,5 Stunden (links) und 24 Stunden (rechts) nach Bestrahlung. Für Sham- und Broadbeam-Bestrahlungen wurden jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichungen über $N=9-13$ Schnitte von 3-4 unabhängigen Hautmodellen berechnet. Für die Hautmodelle nach MRT ist der Mittelwert \pm Standardabweichung für die mittlere Anzahl der Foci pro Zelle in den Valleys nach MRT abgebildet ($N=6-8$ Schnitte von 2-3 unabhängigen Hautmodellen). * p -Wert <0.05 , n.s. = nicht signifikant.

Als nächstes wurde das Hautgewebe auf mögliche Bystander-Effekte untersucht. Dazu wurden die DNA-Schäden explizit der Valleyregion nach MRT mit 1 Gy Valleydosis untersucht und mit den DNA-Schäden der entsprechenden Broadbeam-Bestrahlung mit 1 Gy verglichen. Da 53BP1-Foci hier den führenden Marker der DDR darstellte, wurde dieser als vergleichender Endpunkt genommen. Eine Übersicht ist in Abbildung 20 und Tabelle 2 abgebildet.

Die Kontroll-Hautmodelle (Sham-bestrahlte Modelle) wiesen nur eine geringe Anzahl an 53BP1-Foci auf, welche nach 24 Stunden ($0,08 \pm 0,02$ fpc) keine signifikanten Unterschiede zu 0,5 Stunden ($0,07 \pm 0,01$ fpc) zeigten. Der prozentuale Anteil an Zellen mit 53BP1-Foci (%cwf) betrug dabei zu beiden Zeitpunkten etwa 5% ($5,1 \pm 1,2$ % bei 0,5 h und $5,1 \pm 0,2$ % bei 24 h).

Nach Broadbeam-Bestrahlung mit 1 Gy kam es nach 0,5 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der mittleren Anzahl an 53BP1-Foci pro Zelle auf $1,45 \pm 0,17$ fpc mit $54,0 \pm 3,8$ %cwf. Nach 24 Stunden sank die mittlere Anzahl auf $0,31 \pm 0,02$ fpc mit $24,3 \pm 1,4$ %cwf.

Die Mittelwerte wurden für die Bestrahlungen mit Sham- und Broadbeam über N=9-13 Hautschnitte von 3-4 unabhängigen Hautmodellen berechnet.

0,5 Stunden nach MRT mit einer Valleydosis von 1 Gy (Peakdosis 19 Gy) betrug die mittlere Anzahl der 53BP1-Foci pro Zelle im Valley 2,28 +/- 0,25 fpc mit 66,7 +/- 2,9 %cwf, was einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zu der Anzahl der Foci pro Zelle nach Broadbeam-Bestrahlung mit 1 Gy darstellte. Nach 24 Stunden entsprach die Anzahl der Foci pro Zelle im Valley (0,29 +/- 0,07 fpc mit 22,7 +/- 4,2 %cwf) allerdings wieder der Focianzahl für Broadbeam-Bestrahlung gleicher Dosis nach 24 Stunden. Die fpc lag hierbei sowohl für MRT als auch für Broadbeam noch signifikant über dem Sham-Niveau. Die Auswertung nach MRT erfolgte über N=6-8 Hautschnitte von 2-3 unabhängigen Hautmodellen.

Übersicht über die 53BP1-Foci in den Valleys und Peaks 0,5 und 24 Stunden nach MRT

Zeit	MRT-Peak 19 Gy	MRT-Valley 1 Gy	Broadbeam 1 Gy	Kontrolle
	% cwf			
0,5 h	42,2 +/- 9,3	66,7 +/- 2,9	54,0 +/- 3,8	5,1 +/- 1,2
24 h	30 +/- 7	22,7 +/- 4,2	24,3 +/- 1,4	5,1 +/- 0,2
	fpc			
0,5 h	1,22 +/- 0,32	2,28 +/- 0,25	1,45 +/- 0,17	0,07 +/- 0,01
24 h	0,62 +/- 0,19	0,29 +/- 0,07	0,31 +/- 0,02	0,08 +/- 0,02

Tabelle 2: 53BP1-Foci in den Valleys und Peaks 0,5 h und 24 h nach MRT.

%cwf und fpc für 53BP1-Foci nach MRT jeweils für Peak (19Gy) und Valley (1Gy), nach Broadbeam-Bestrahlung (1Gy) und Sham-Bestrahlung, jeweils 0,5 h und 24 h nach Bestrahlung.

5 Diskussion

5.1 Biologische Dosimetrie mit Mikrokernen und Brücken in Zellkultur

Ausbildung binukleärer Zellen nach Broadbeam-Bestrahlung und MRT

Für die biologische Dosimetrie wurde der etablierte CBMN-Test verwendet. Für diesen Test ist es notwendig, dass die verwendete Zelllinie eine möglichst stabile Mikrokern Hintergrundfrequenz und einen beständigen Karyotyp besitzt, um die Sensitivität zu erhöhen. Von der OECD wird dazu unter anderem die CHO-Zelllinie empfohlen (OECD, 2016). Für diese Arbeit wurde daher die Normalgewebslinie CHO-K1 ausgewählt, die bereits eine etablierte Zelllinie für den Mikrokern-Test darstellt (Aardema et al., 2006). Die Mikronukleus-Frequenz der Kontroll-Proben wurde auf bei $0,094 \pm 0,009$ MN/BNZ berechnet und wies damit eine niedrige spontane Mikronukleus-Frequenz mit nur geringer Varianz auf.

Mikrokerne können nach ihrer Entstehung im Zuge einer weiteren Zellkernteilung aus der Zelle ausgeschlossen oder in einen Hauptzellkern eingeschlossen werden. Deshalb ist es wichtig, Mikrokerne ausschließlich in binukleären Zellen zu zählen, die nur eine nukleäre Teilung nach Bestrahlung vollführt haben (Rodrigues et al., 2018). Die Verdopplungszeit der CHO-K1 Zellen betrug 24 Stunden und stimmt mit der in anderen Publikationen angegeben Zeit von 20-24 Stunden überein (Safari and Akbari, 2022; Xu et al., 2017). In verschiedenen Studien wurde als Inkubationszeit für Cytochalasin B 24 Stunden und weniger angegeben (Le Hégarat et al., 2004; Soloneski et al., 2015). Da sich die Zellteilung aufgrund der Bestrahlung verzögert, wurde in dieser Arbeit eine etwas längere Inkubationszeit als die Verdopplungszeit von 24 Stunden gewählt. Nach 27 Stunden war ein signifikant größerer Anteil an BNZ als nach 24 Stunden zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt haben sich bei 0 Gy bereits 85% aller Zellen einer Zellteilung unterzogen und lagen als binukleäre Zellen vor. Bei 4 Gy sank der Anteil auf etwa weniger als die Hälfte. Diese Dosisabhängigkeit war auch nach MRT in Abhängigkeit von der Distanz zum Peak zu erkennen. Mit abnehmender Dosis in Richtung Valley nahm der Anteil an binukleären Zellen zu.

Es ist zu erkennen, dass die Bestrahlung sowohl nach Broadbeam als auch nach MRT mit zunehmender Dosis einen inhibierenden Effekt auf den Zellzyklus und somit dem Anteil an binukleären Zellen hat. Mit zunehmender Dosis nimmt der DNA-Schaden durch die ionisierende Strahlung zu (Lomax et al., 2013). Durch die daraus folgende Reparatur kommt es zu einem verlängerten Zellzyklus-Arrest in der G2-Phase. Nach erfolgreicher Reparatur kommt

es wieder zu einer Progression im Zellzyklus. Gelingt die Reparatur nicht, kommt es zum Zelltod und einem Exit aus dem Zellzyklus (Lonati et al., 2021). Hieraus lässt sich die Verzögerung in der Bildung binukleärer Zellen mit steigender Dosis erklären.

Erstellung der Referenzkurven für die biologische Dosimetrie mit Mikrokernen und Brücken

Um Mikrokern als Biodosimeter verwenden zu können, wurde zunächst eine Referenzkurve erstellt, womit die Mikrokern-Frequenz in die entsprechende biologische Dosis konvertiert werden konnte. Für die Mikrokern erkannte man dabei eine lineare Abhängigkeit der Mikrokernanzahl pro binukleärer Zelle von der applizierten Dosis. In anderen Studien wurden Referenzkurven für Mikrokern bei Bestrahlung mit Röntgenstrahlen unter anderem mit linearer Regression (Zlobinskaya et al., 2013) und linear-quadratischer Regression (Schmid et al., 2009) beschrieben. Die Referenzkurve für Brücken wies ebenfalls eine lineare Dosisabhängigkeit auf. Im Vergleich mit Mikrokern erkannte man, dass bei einer Erhöhung der Dosis um 1 Gy etwa zehn Mal mehr Mikrokern pro BNZ gebildet wurden als Brücken. Mikrokern weisen also eine höhere Sensitivität auf. In einer anderen Studie konnte für Brücken bei Bestrahlung mit ^{60}Co γ -Strahlung ebenfalls eine lineare Dosisabhängigkeit gezeigt werden (Tian et al., 2016). Eine lineare Abhängigkeit konnte jedoch nur bis 4 Gy beobachtet werden. Ab einer Dosis von größer als 4 Gy kam es zu einer Abflachung der Kurve mit einer erniedrigten Mikronukleus-Frequenz pro BNZ. Dieser Effekt wurde auch von Schmid et al. beschrieben (Schmid et al., 2009). Gründe hierfür können vielseitig sein. Bei höheren Dosen kommt es zu einer vermehrten Verzögerung im Zellzyklus, wodurch die Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung noch kein binukleäres Stadium erreicht haben. Obwohl für Dosen höher als 4 Gy noch genug Zellen gescored werden konnten, kommt es bei Zellen mit mehreren Abberationen bereits während der ersten Karyokinese und damit vor dem Ende der Cytokinese zum Zelltod, sodass diese nicht mehr als Mikrokern tragende binukleäre Zellen gescored werden können. Es könnte auch sein, dass mit höherer Dosis ein Mikrokern mehrere azentrische Fragmente trägt, was auch zu einer Abflachung der Kurve beiträgt. Außerdem entsprechen Zellen, die einer höheren Dosis ausgesetzt sind, häufig nicht mehr den Scoring-Kriterien, da zum Beispiel die Zellmembran geschädigt ist oder mehrere Mikrokern sich überlappen und nicht mehr klar abgrenzbar sind. Das strikte Einhalten der Scoring Kriterien kann deshalb auch einer der Gründe sein, weshalb die Referenzkurve ab einer Dosis von größer als 4 Gy keiner linearen Regression mehr entspricht und abflacht (Huber et al., 1994; Schmid et al., 2009).

Charakterisierung der Mikrostrahlen mit biologischer Dosimetrie

Für die Charakterisierung der Mikrostrahlen wurden die CHO-K1 Zellen mit Mikrostrahlen bestrahlt und daraufhin die biologischen Endpunkte Mikrokerne und Brücken mit dem CBMN-Test in situ ausgewertet. Dazu wurde eine separate biologische Dosimetrie für die Peakregion und die Valleyregion durchgeführt.

Für die Dosimetrie der Peakregion wurde eine Peakdosis von 2 Gy ausgewählt. Diese Dosis befand sich noch im linearen Bereich der Referenzkurve und stellt außerdem eine häufig benutzte Dosis in der fraktionierten Strahlentherapie dar (Ghaderi et al., 2022). Sowohl in den Peaks als auch in den Valleys konnte nach Umwandlung der Mikrokern-Frequenz anhand der Referenzkurve eine Übereinstimmung der biologischen Dosen mit der durch Gafchrom durchgeführten physikalischen Dosimetrie festgestellt werden. Die Peakbreite bei halbem Maximum war mit 60 μm größer als die physikalisch gemessene Peakbreite von 50 μm . Da die Zellen in Bins von 12,5 μm gescored wurden, um genügend binukleäre Zellen für die Auswertung zu gewährleisten, war eine genauere örtliche Auflösung nicht möglich und es könnte daher zu dieser Abweichung in der gemessenen Peakbreite kommen. Es wurde ein gemittelter ctc-Wert von 402 μm gemessen, was auch mit der applizierten Mikrostrahlgeometrie übereinstimmte.

In anderen Studien konnten für geringe Dosen von 0,5 Gy bereits signifikante Unterschiede zu Kontrollbestrahlungen nachgewiesen werden (Lusiyanti et al., 2016). Diese Valleydosis hätte bei einer PVDR von 40,67 auch mit einer geringfügig höheren Peakdosis als 2 Gy erreicht werden können, jedoch müssen hier sowohl Schwankungen in der applizierten Bestrahlung selbst als auch in der physikalischen Dosimetrie beachtet werden. Da die Valleyregion für die Normalgewebstoleranz und der Untersuchung von Bystandereffekten von besonderer Bedeutung ist (Kapitel 1.1 und 1.2), wurde für eine exaktere Auswertung der Dosis in den Valleys deshalb eine separate Dosimetrie durchgeführt. Für die Bestrahlungen wurde hier ebenfalls eine Dosis von 2 Gy gewählt. Auch hier stimmte die biologische Dosis mit der physikalisch berechneten Dosis überein.

Bei einer Valleydosis 2 Gy und einer PVDR von 40,67 nimmt die Dosis zu den Peaks hin stark zu und übersteigt ab einem gewissen Punkt die Dosis von 4 Gy, bis zu welcher eine Dosimetrie durchgeführt werden kann. Eine Gegenüberstellung der Dosimetrie mit einer Valleydosis von 2 Gy und der Dosimetrie mit einer Peakdosis von 2 Gy zeigte, dass die Werte der Dosimetrie mit einer Peakdosis von 2 Gy ab einer Distanz von 81 μm bis zum Peakzentrum steil anstiegen.

Im Gegensatz dazu war kein entsprechender Anstieg der Werte in der Dosimetrie mit einer Valleydosis von 2 Gy zu erkennen und die Dosen lagen nicht mehr im Fehlerbereich der entsprechenden Werte der Dosimetrie mit einer Peakdosis von 2 Gy. Es ist anzunehmen, dass die Dosis bei der Dosimetrie mit einer Valleydosis von 2 Gy ab diesem Punkt bereits weit über der mit Mikrokernen möglichen Dosimetrie lag. Der Vergleich beider Graphen zeigte zudem, dass die Dosimetrie für die Valleyregion mit der Valleydosis von 2 Gy eine genauere Dosimetrie ermöglicht als die Dosimetrie mit der Peakdosis von 2 Gy. Dies lässt erkennen, dass eine separate Dosimetrie für die Peak- und Valleyregion sinnvoll ist.

Als weiterer Endpunkt für die biologische Dosimetrie wurden Chromosomenbrücken verwendet. Auch hier konnte die biologische Dosimetrie die physikalische Dosimetrie bestätigen. Dabei wies die Dosimetrie jedoch größere Varianzen auf als die Dosimetrie mit Mikrokernen. Die Dosimetrie mit Mikrokernen als biologischer Endpunkt stellt demzufolge eine zuverlässigere und genauere Methode da als mit Brücken. Dies ist aufgrund der Referenzkurve und des geringeren Anteiles an Zellen mit Brücken bereits zu erwarten: Bei einer Dosis von 2 Gy nach MRT wiesen etwa 3,5-mal so viele binukleäre Zellen Mikrokerne auf als Brücken. Während bei mehr als 70% aller Zellen mit NPB auch MN zu erkennen waren, waren nur bei etwa mehr als 20% aller Zellen mit MN auch NPB zu beobachten. Zwischen der Peakregion nach MRT mit einer Peakdosis von 2 Gy und der Valleyregion nach MRT mit einer Valleydosis von 2 Gy waren dabei keine signifikanten Unterschiede zu sehen.

Auch wenn die Dosimetrie mit Brücken nicht so genau ist wie mit Mikrokernen, ist zu erkennen, dass eine biologische Dosimetrie für Mikrostrahlen möglich ist. Zumal für das Scoring der Brücken keine zusätzliche Aufbereitung von Proben nötig ist und der CBMN-Assay das gleichzeitige Scoring von Brücken neben Mikrokernen ermöglicht. Zu beachten ist jedoch, dass die Auswertung der Brücken nach MRT aufgrund des niedrigen Anteils an Zellen mit NPB auf der vorherigen Bestimmung der Position der Peak und Valleys anhand von Mikrokernen basiert. Somit ist eine örtliche Auflösung anhand von NPB nur durch die Mitanalyse von MN möglich.

Während Mikrokerne auf vielen unterschiedlichen Wegen (Kapitel 3.1.5) entstehen können, werden Brücken durch dizentrische Chromosomen gebildet, die durch Fehlreparatur von DNA-Brüchen oder Telomer-Verschmelzung hervorgerufen werden. Durch diese sehr spezifischen Entstehungsweisen könnte das Scoring zusätzliche Informationen liefern und bei der Interpretation der Mikrokerne behilflich sein (Cheong et al., 2013). Eine Bestimmung der NPB

kann als eine gute und einfache Ergänzung zu der biologischen Dosimetrie mit MN betrachtet werden.

Im Gegensatz zu anderen Studien der Bystander-Effekte in Zellkultur (Dickey et al., 2009; Han et al., 2007) wurden hier in der Dosimetrie sowohl mit Mikrokernen als auch mit Brücken keine Bystander-Effekte in der Valleyregion nachgewiesen. Es wurden verschiedene Wege aufgezeichnet, durch die Bystander-Effekte entstehen können. Hierzu gehören unter anderem direkter Zellkontakt und die Freisetzung von Zytokinen and Chemokinen in das Medium (Daguenet et al., 2020). In Zellkultur mit konfluent ausgesäten Zellen spielt für Bystander-Effekte die direkte Zellkommunikation über Gap-junctions eine bedeutende Rolle (Hei et al., 2011). Dagegen haben die Zellen für den hier verwendeten CBMN-Test wenig bis gar keinen entsprechenden Zellkontakt, da sie in einem nicht zu dicht ausgesäten Monolayer fixiert wurden, um eine automatische Erkennung der BNZ zu gewährleisten. Auch wurden in einer Studie mit normalen konfluenten menschlichen Fibroblasten nach Inhibition von GJIC bei Low-LET-Bestrahlungen im Gegensatz zu High-LET-Bestrahlungen keine signifikanten Unterschiede in der Induktion von Mikrokernen festgestellt. Dies könnte darauf hindeuten, dass GJIC zur Entstehung von Bystander-Effekten nach High-LET-Bestrahlungen, nicht aber nach Low-LET-Bestrahlungen beitragen. Es ist festgestellt worden, dass für letzteres jedoch die Freisetzung von Faktoren in das Medium von Bedeutung ist (Autsavapromporn et al., 2013). Durch den Austausch des Mediums kurz nach Bestrahlung mit Medium, welches Cytochalasin B enthält, könnten hier potenzielle Faktoren eliminiert worden sein. In weiteren Experimenten könnte der CBMN-Assay zum Beispiel ohne Mediumwechsel versucht oder bei Bestrahlungen mit hoher LET angewendet werden. Insgesamt sind Bystander-Effekte jedoch noch wenig verstanden und weitere Forschung über die Entstehung und die Mechanismen erforderlich.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit dem CBMN-Assay die physikalische Dosimetrie sowohl in der applizierten Dosis als auch in der verwendeten Mikrostrahlgeometrie bestätigt werden konnte. Die Ergebnisse zeigen, dass der CBMN-Assay mit Mikrokernen eine äußerst zuverlässige Methode der biologischen Dosimetrie darstellt und eine genaue Auswertung der DNA-Schäden auch auf einer Mikrometer-Skala ermöglicht. Mithilfe dieser Methode ist dies die erste Studie, in der die genaue biologische Dosis in den Peaks und Valleys nach MRT bestimmt werden konnte. Ein limitierender Faktor ist hier jedoch, dass mit diesem Assay eine Dosimetrie nur bis zu einer Dosis von 4 Gy möglich ist.

5.2 DNA-Schäden nach MRT im Hautgewebe

Räumliche Auflösung der DNA-Schäden 0,5 h nach MRT

Durch den dreidimensionalen Aufbau und die direkten Zellkontakte, die es ermöglichen, gap junctions auszubilden, können rekonstruierte Hautmodelle neben der Zellkultur eine realitätsgetreuere Abbildung gewährleisten und zusätzliche Informationen liefern. Bei der Analyse der räumlichen Verteilung der DNA-Schäden war zu erkennen, dass sich nach 0,5 Stunden in regelmäßigem Abstand scharf gebündelte pan- γ H2AX positive Zellen befanden. Pan- γ H2AX positive Zellen entstehen, wenn H2AX als Antwort auf DNA-Schäden nicht nur an den Stellen der Doppelstrangbrüche phosphoryliert wird, sondern auch in unbeschädigtem Chromatin des ganzen Nukleus. Diese Antwort wird durch die Aktivität der Kinasen DNA-PK und ATM fernab des Doppelstrangbruches hervorgerufen. Die zellkernweite Antwort entsteht dabei wahrscheinlich durch kleine DNA-Fragmente, hervorgerufen durch die ionisierende Bestrahlung oder durch die Diffusion der Kinasen von der Stelle der Doppelstrangbrüche über den ganzen Zellkern. Die Ausbildung von pan- γ H2AX hängt dabei von der Dosis und der Menge an DNA-Schäden ab (Ding et al., 2016; Meyer et al., 2013). So werden nach 1 Gy γ -Bestrahlung etwa 40 DSB pro Zelle gebildet (Ward, 1994), was hier in den Regionen mit einer Peakdosis von 19 Gy entsprechend zu etwa 800 DSB führt. Pan- γ H2AX positive Zellen durch ionisierende Strahlung konnten in anderen Studien auch nach Schwerionen-Bestrahlung in menschlichen Fibroblasten und verschiedenen tierischen Zelllinien (Meyer et al., 2013), nach pMBRT (Proton minibeam radiotherapy) mit einer mittleren Dosis von 2 Gy in rekonstruierter Epidermis (Scherthan et al., 2022), in Schweinehaut nach Bestrahlung mit 50 Gy γ -Strahlen (Ahmed et al., 2012) und in menschlichen Lymphozyten nach X-Ray (Ding et al., 2016) und alpha-Partikel Bestrahlung (Horn et al., 2015) nachgewiesen werden. Zwischen den Anhäufungen von pan- γ H2AX positiven Zellen wurde ein Abstand von 430 μ m ermittelt. Der Wert war größer als der physikalisch berechnete ctc-Wert von 400 μ m und wies auch größere Schwankungen auf. Technisch ist es schwierig, Gewebeschnitte genau senkrecht zu den Mikrostrahlen anzufertigen. Kommt es nun zu Abweichungen in der Schnittebene, kann dies auch zu Schwankungen in der Abbildung der ctc-Werte führen.

Betrachtet man die Foci für γ H2AX und 53BP1, konnte man erkennen, dass vor allem Zellen mit 53BP1-Foci mit einem Anteil von 59% an allen Zellen überwogen. γ H2AX Foci stellten mit 2,6% nur einen sehr kleinen Teil dar und befanden sich analog der pan- γ H2AX positiven Zellen überwiegend in Bereichen hoher Dosen in den Peaks. Zellen mit 53BP1-Foci waren

überwiegend in der Valleyregion mit niedrigerer Dosis vorhanden und nahmen mit zunehmender Dosis Richtung Peak ab, während pan- γ H2AX positive Zellen nur vereinzelt in den Valleys vorhanden waren und Richtung Peakzentrum zunahmen. Keratinozyten, die sich terminal differenzieren, weisen eine verlängerte G1-Phase auf (White et al., 2005). Die DNA-Reparatur in dieser Phase des Zellzyklus basiert vor allem auf dem NHEJ-Weg, wofür 53BP1 ein wichtiger Mediator darstellt (Santivasi and Xia, 2014). Scherthan et al. führten an, dass dies das Überwiegen der 53BP1-Foci im Epidermismodell bei geringen Dosen erklären könnte (Scherthan et al., 2022). Ein möglicher Grund für die Abnahme der 53BP1-Foci bei höheren Dosen könnte sein, dass es bei einer größeren Anzahl an Foci schwierig ist, einzelne Foci gut voneinander zu unterscheiden und nicht mehr als separate Foci in die Auswertung eingehen, wodurch weniger Foci gescored werden als tatsächlich vorhanden sind. Pan- γ H2AX-positive Zellen wurden aus der Foci-Auswertung gänzlich rausgenommen, da hier durch das pan- γ H2AX-Signal γ H2AX-Foci nicht mehr gescored werden konnten und vereinzelt bis gar keine 53BP1-Foci beobachtet wurden. Dass in den pan- γ H2AX positiven Zellen keine 53BP1-Foci zu beobachten waren, könnte daran liegen, dass die Ausbildung von pan- γ H2AX die Bildung von 53BP1 beeinflusst und auch dies zu einer Abnahme der 53BP1 Foci mit zunehmender Dosis führt. So wurde auch in der Studie von Scherthan et al. in pan- γ H2AX positiven Zellen keine relevanten 53BP1-Foci beobachtet (Scherthan et al., 2022). In der Studie von Meyer et al. konnte für Bestrahlungen mit hoher LET jedoch gezeigt werden, dass die pan- γ H2AX Antwort keine Beeinflussung auf die Ausbildung von 53BP1-Foci hat (Meyer et al., 2013). Auch in Lamkowski et al. konnten bei Bestrahlung von Lymphozyten mit 50 Gy γ -Strahlung in pan- γ H2AX positiven Zellen noch 53BP1-Foci beobachtet werden (Lamkowski et al., 2014). So könnte dies darauf hinweisen, dass hier die Abwesenheit von 53BP1-Foci in pan- γ H2AX positiven Zellen evtl. auch technisch, z.B. durch andere IHC-Färbungsbedingungen in dem hier verwendeten rekonstruierten Hautmodell erklärbar wäre. Diese Gründe könnten zu der beobachteten Abnahme der 53BP1-Foci als Ausdruck einer möglichen Unterschätzung der tatsächlichen Foci Anzahl in den Peaks führen.

Räumliche Auflösung der DNA-Schäden 24 h nach MRT

Auch nach 24 Stunden war die Mikrostrahlgeometrie noch erhalten, man erkannte jedoch keine scharf gebündelten pan- γ H2AX positiven Zellen mehr. Nach 24 Stunden sank der Anteil pan- γ H2AX positiver Zellen von ca. 7% auf 0,14%, welches dem Anteil in Sham-bestrahlten Hautmodellen entsprach. Pan- γ H2AX wird als ein Indikator für Zelltod beschrieben und könnte

dadurch die Abwesenheit von pan- γ H2AX positiven Zellen nach 24 Stunden erklären (Moeglin et al., 2019; Ding et al., 2016; de Feraudy et al., 2010). Für den frühen Zeitpunkt von 0,5 Stunden ist pan- γ H2AX als Ausdruck von Apoptose jedoch eher unwahrscheinlich: Für EpiCs-Hautmodelle nach pMBRT mit einer Peakbreite von 66 μ m und einer Peakdosis von 27 Gy konnten in der Studie von Scherthan et al. nach 0,5 h keine Caspase-3-positiven Zellen festgestellt werden (Scherthan et al., 2022), was darauf hindeutet, dass auch hier pan- γ H2AX nach 0,5 h kein Zeichen eines beginnenden Zelltodes ist. Auch in den Publikationen von Horn et al. und Meyer et al. wurde pan- γ H2AX nicht mit Zelltod in Verbindung gebracht (Horn et al., 2015; Meyer et al., 2013). Eine andere Erklärung für die Abnahme der pan- γ H2AX positiven Zellen könnte die Reparatur der DNA-Schäden darstellen. Allerdings wurden in anderen Studien aufgezeigt, dass das Verschwinden des pan- γ H2AX-Signals wahrscheinlich auch nicht auf DNA-Reparatur zurückzuführen ist (Lamkowski et al., 2014; Meyer et al., 2013) bzw. nicht auf DNA-Reparatur durch non-homologous end joining (NHEJ) oder homologous recombination (HR) basiert (Horn et al., 2015). Die Ausbildung von pan- γ H2AX ist also wie auch in der Studie von Meyer et al. beschrieben transient und die Abnahme nach 24 Stunden wahrscheinlich weder auf Apoptosis noch auf NHEJ/HR basierende DNA-Reparatur zurückzuführen (Meyer et al., 2013).

Anstelle der pan- γ H2AX positiven Zellen in den Peaks war nach 24 Stunden eine Anhäufung von Zellen mit erhöhten 53BP1-Foci zu erkennen. Nach 24 Stunden war der Anteil der Zellen mit 53BP1-Foci über das gesamte Hautgewebe betrachtet zwar um mehr als die Hälfte gesunken, es waren jedoch noch signifikant mehr Zellen mit 53BP1-Foci zu erkennen als in den Kontrollen. Die fpc für 53BP1 war in den Peaks nach 24 Stunden im Vergleich zu 0,5 Stunden um etwa die Hälfte gesunken, die fpc in den Valleys sogar um beinahe 90%. Einen Grund für den Unterschied könnte eine langsamere Reparatur der DSB in den Peaks sein, da die Reparatur von der Komplexität der DNA-Doppelstrangbrüche beeinflusst wird (Ernst Schmid et al., 2012). Während komplexe DSB vor allem bei High-LET-Bestrahlung auftreten, wurden auch bei Low-LET-Bestrahlung komplexe DSB beobachtet, deren Ausbildung eine Dosisabhängigkeit zeigt (Loucas and Cornforth, 2001). Mit einer Peakdosis von 19 Gy zeigte die Peakregion hier eine 19-fach höhere Dosis als die Valleyregion auf. Auch in Neumaier et al. wurde eine Dosisabhängigkeit der Reparatur bei Low-LET-Bestrahlung suggeriert (Neumaier et al., 2012). Wahrscheinlich spielte hier jedoch vor allem die Unterschätzung der 53BP1-Foci in den Peaks nach 0,5 Stunden, wie zuvor bereits beschrieben, eine Rolle. Es könnte argumentiert werden, dass die Anhäufung der 53BP1-Foci nicht die Peaks, sondern analog zu den 53BP1 nach 0,5 Stunden die Valleys darstellten. Jedoch sah man hier im

Gegensatz zu der Anhäufung im Valley eine scharfe Ansammlung von Foci mit einem steilen Abfall. Auch waren γ H2AX Foci, wenn auch nur vereinzelt vorhanden, nach 24 Stunden hauptsächlich in den Anhäufungen der Zellen mit 53BP1-Foci zu finden, was auch dafür sprach, dass diese Anhäufungen den Peaks entsprachen. Eine genaue Analyse der γ H2AX-Foci mittels Matlab war nach 24 Stunden aufgrund der geringen Anzahl der γ H2AX-Foci jedoch nicht möglich.

Insgesamt ist zu erkennen, dass die applizierte Mikrostrahlgeometrie, wenngleich nicht so genau wie in 2D-Kultur in situ, im Hautgewebe wiedergegeben werden kann und das verwendete Hautgewebe gut geeignet ist, um DNA-Schäden nach MRT zu charakterisieren. Im Gegensatz zur Peakregion, bei der durch hohe Peakdosen und die Ausbildung von pan- γ H2AX positiven Zellen die Analyse der Focizahl beeinträchtigt ist, ist die Valleyregion einer Analyse der Focizahl gut zugänglich. Während in anderen Studien mit dreidimensionalen Hautmodellen auch eine starke γ H2AX-Antwort beobachtet werden konnte (Redon et al., 2009; Sedelnikova et al., 2007), war auch in der Studie von Suzuki et al. das γ H2AX-Signal beeinträchtigt (Suzuki et al., 2010). 53BP1 wurde sowohl von Suzuki et al. als auch von Su et al. als geeigneter alternativer Marker für 3D Hautmodelle beschrieben (Su et al., 2010; Suzuki et al., 2010).

Zusammenfassend sind 53BP1-Foci als wesentlicher Marker der DDR der Valleyregion sowohl nach 0,5 Stunden als auch nach 24 Stunden gut geeignet für die Untersuchung auf mögliche Bystander-Effekte im vorliegendem rekonstruierten Hautgewebe.

Untersuchung der Valleyregion nach MRT auf mögliche Bystander-Effekte

Als nächstes wurde das Hautgewebe auf mögliche Bystander-Effekte untersucht. Dazu wurden die 53BP1-Foci explizit in der Valleyregion nach MRT mit 1 Gy Valleydosis (PVDR 36,6) mit den Foci nach Broadbeam-Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy verglichen. Nach 0,5 Stunden zeigte die mittlere Anzahl der 53BP1-Foci pro Zelle in den Valleys nach MRT einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zu der Anzahl der 53BP1-Foci nach Broadbeam-Bestrahlung auf. Nach 24 Stunden waren zwischen MRT und Broadbeam-Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede mehr zu beobachten. Zwar erkannte man einen signifikanten Unterschied der fpc zwischen MRT und Broadbeam-Bestrahlung nach 0,5 Stunden, um die tatsächliche Abweichung in der biologischen Dosis eruieren zu können, bedarf es jedoch einer Referenzkurve für die Anzahl der 53BP1-Foci pro Zelle in Abhängigkeit der Dosis. In einer anderen Studie war eine lineare Abhängigkeit zwischen der Ausbildung von 53BP1-Foci und der applizierten X-Ray Dosis im 3D Gewebe zu erkennen (Suzuki et al., 2010). Eine nicht-

lineare Dosisabhängigkeit wurde in einer Studie von Su et al. beobachtet und eine lineare-quadratische/lineare Abhängigkeit konnte von Marková et al. für γ -Strahlung in menschlichen Fibroblasten nachgewiesen werden (Marková et al., 2007; Su et al., 2010). Auch nach 24 Stunden wurde eine lineare Dosisabhängigkeit für γ H2AX-Foci im 3D Gewebe (Redon et al., 2009) und für 53BP1 in menschlichen Fibroblasten (Marková et al., 2007) beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass hier neben dem Zeitpunkt von 0,5 Stunden auch zu dem späteren Zeitpunkt von 24 Stunden noch eine lineare Dosisabhängigkeit bestehen könnte und ein Vergleich der Dosis zwischen Broadbeam-Bestrahlungen und MRT möglich wäre. Insgesamt gibt es noch nicht viele Studien, die Bystander-Effekte in dreidimensionalem rekonstruierten Hautgewebe untersuchen. Die hier gegenüber Broadbeam erhöhten Foci weisen auf mögliche Bystander-Effekte hin. Sowohl in den Studien von Sedelnikova et al. als auch von Belyakov et al. konnten nach MRT mit alpha-Partikel Bystander-Effekte in 3D rekonstruiertem Gewebe nachgewiesen werden, wobei Bystander-Effekte in Sedelnikova et al. auch nach Tagen noch nachgewiesen werden konnten (Belyakov et al., 2005; Sedelnikova et al., 2007). In dieser Studie konnten nach 24 Stunden keine Unterschiede mehr zu Broadbeam-Bestrahlungen festgestellt werden, was darauf hinweisen könnte, dass durch Low-LET-Bestrahlungen hervorgerufene Bystander-Effekte möglicherweise schneller repariert werden als nach High-LET-Bestrahlungen.

Auch wenn das rekonstruierte Hautgewebe bereits durch die Mehrschichtung der Zellen und interzellulären Kontakte die Untersuchung von zellulären Effekten in einer realitätsgetreueren Abbildung ermöglicht als in Zellkultur, beruht die biologische Wirkung der Bestrahlung mit MRT neben den Bystander-Effekten unter anderem auch auf der empfindlicheren Tumervaskulatur (Bouchet et al., 2015) und der Beeinflussung der Immunreaktion im Tumorgewebe (Bouchet et al., 2013b). Beides ist hier im rekonstruierten Epidermisgewebe nicht vorhanden. Für deren Untersuchung sind Experimente im Tiermodell nötig (Rothkamm et al., 2012).

Insgesamt ist zu erkennen, dass die Immunhistochemie in 3D-rekonstruiertem Hautgewebe eine wertvolle Methode darstellt, die es ermöglicht, biologische Wirkungen auf einer Mikrometerskala, wie Bystander-Effekte gezielt in der Valleyregion nach MRT, zu analysieren. Weitere Experimente wie die Etablierung einer Referenzkurve sind jedoch für eine vollständige biologische Dosimetrie notwendig.

6 Fazit

In dieser Arbeit war es möglich, mithilfe des CBMN-Assays zum ersten Mal die exakte biologische Dosis der Peak und Valleys der Mikrostrahlen in situ zu bestimmen. Durch die Übereinstimmung der biologischen und physikalischen Dosimetrie konnte hier die physikalische Dosimetrie mit Gafchrom-Film für die Mikrostrahltherapie validiert werden. Mikrokerne erwiesen sich als geeignete Endpunkte, wobei nukleoplasmatische Brücken die biologische Dosimetrie ergänzen können. Die hier aufgeführte biologische Dosimetrie in situ könnte in Zukunft für verschiedene Mikrostrahl-Bestrahlungsmodalitäten angewendet werden und physikalische Dosimetrie ergänzen. Rekonstruiertes Hautgewebe erwies sich darüber hinaus als geeignetes Modell für die Untersuchung von DNA-Schäden im dreidimensionalen Raum. Hierbei überwog die Ausbildung von 53BP1-Foci, welche als führende Marker der DDR verwendet werden können. Es konnte in den Valleys nach Bestrahlung mit Mikrostrahlen im Vergleich zu Broadbeam-Bestrahlung eine signifikant höhere 53BP1-Foci-Anzahl pro Zelle festgestellt werden, was auf mögliche Bystander-Effekte hindeuten könnte. Die Etablierung einer Referenzkurve ist jedoch für eine vollständige biologische Dosimetrie notwendig. Um eine noch vollständigere und realitätsgetreuere Abbildung zu erhalten, könnten in Zukunft auch biologische Dosimetrien für Mikrostrahltherapie im Tierversuch unternommen werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die biologische Dosimetrie in situ mit dem CBMN-Assay und die Immunhistochemie mit Bestimmung der γ H2AX- und 53BP1-Foci geeignete und zuverlässige Methoden darstellen, um die DNA-Schäden und deren räumliche Auflösung in den Peak- und vor allem in den Valleyregionen nach MRT zu erfassen. Es ist dabei zu erkennen, dass die Geometrie der Mikrostrahlen trotz der Dimensionen im Mikrometerbereich sowohl in Zellkultur als auch im dreidimensionalen Gewebe abgebildet werden kann. Mögliche Bystander-Effekte könnten durch den Einfluss auf die Valleydosis eine Rolle in der Wirkung von Mikrostrahlen spielen, wobei dahingehend noch weitere Forschung zum Verständnis der zugrundeliegenden biologischen Mechanismen der Mikrostrahltherapie notwendig ist.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Abbildung von Mikrostrahlen.....	3
Abbildung 2: Entstehung von Mikrokernen und nukleoplasmatischen Brücken während der Kernteilung.	10
Abbildung 3: Wachstumskurve der CHO-K1-Zellen.....	18
Abbildung 4: Anteil binukleärer Zellen an der Gesamtzahl der Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und Dosis.	19
Abbildung 5: BNZ/Zellzahl [%] in Abhängigkeit von der Dosis.	20
Abbildung 6: BNZ/Zellzahl [%] nach MRT in Abhängigkeit vom Abstand zum Peak.	21
Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopie-Bild von Mikrokernen in binukleären Zellen.	22
Abbildung 8: Referenzkurve für Mikrokorne in Abhängigkeit von der Dosis.....	22
Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopie-Bild von Brücken in binukleären Zellen.	23
Abbildung 10: Referenzkurve für NPB in Abhängigkeit von der Dosis.....	23
Abbildung 11: Mittlere Anzahl an Mikrokernen entlang der x-Achse.	24
Abbildung 12: Dosimetrie mit Mikrokernen nach MRT mit einer Peakdosis von 2 Gy.	25
Abbildung 13: Dosimetrie der Valleyregion mit Mikrokernen nach MRT mit einer Valleydosis von 2 Gy.....	26
Abbildung 14: Vergleich der Dosimetrie für den Valleyabschnitt zwischen MRT mit einer Peak- und Valleydosis von 2 Gy.	27
Abbildung 15: Dosimetrie mit NPB nach MRT mit einer Peak- und Valleydosis von 2 Gy.	28
Abbildung 16: DNA-Schäden im Verlauf 0,5 h und 24 h nach MRT.	29
Abbildung 17: Räumliche Aufteilung der DNA-Schäden für Broadbeam-Bestrahlung und MRT nach 0,5 h und 24 h, dargestellt über den ganzen Hautgewebsschnitt.	32
Abbildung 18: Räumliche Aufteilung der DNA-Schäden im Vergleich 0,5 h nach MRT.	34
Abbildung 19: Räumliche Aufteilung der 53BP1-Foci 24 h nach MRT.	34
Abbildung 20: Vergleich der 53BP1 – Foci der Valleyregion nach MRT und Broadbeam-Bestrahlung.	35

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der DNA-Schäden für MRT, Broadbeam-Bestrahlung und Kontrollen.	31
Tabelle 2: 53BP1-Foci in den Valleys und Peaks 0,5 h und 24 h nach MRT.....	36

Literaturverzeichnis

- Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelster, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D., Lorge, E. (2006). SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test III. Using CHO cells. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 607, 61–87.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.04.002>
- Ahmed, E.A., Agay, D., Schrock, G., Drouet, M., Meineke, V., Scherthan, H. (2012). Persistent DNA Damage after High Dose In Vivo Gamma Exposure of Minipig Skin. *PLOS ONE* 7, e39521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039521>
- Allen, C., Her, S., Jaffray, D.A. (2017). Radiotherapy for Cancer: Present and Future. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 109, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.01.004>
- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., Noel, G. (2015). Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 5517–5527.
<https://doi.org/10.3390/ijms16035517>
- Attix, F.H. (2007). Dosimetry Fundamentals, in: *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp. 264–291.
<https://doi.org/10.1002/9783527617135.ch11>
- Autsavapornporn, N., Suzuki, M., Funayama, T., Usami, N., Plante, I., Yokota, Y., Mutou, Y., Ikeda, H., Kobayashi, K., Kobayashi, Y., Uchihori, Y., Hei, T.K., Azzam, E.I., Murakami, T. (2013). Gap Junction Communication and the Propagation of Bystander Effects Induced by Microbeam Irradiation in Human Fibroblast Cultures: The Impact of Radiation Quality. *Radiat. Res.* 180, 367–375. <https://doi.org/10.1667/RR3111.1>
- Belyakov, O.V., Mitchell, S.A., Parikh, D., Randers-Pehrson, G., Marino, S.A., Amundson, S.A., Geard, C.R., Brenner, D.J. (2005). Biological effects in unirradiated human tissue induced by radiation damage up to 1 mm away. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14203–14208. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505020102>
- Bouchet, A., Lemasson, B., Christen, T., Potez, M., Rome, C., Coquery, N., Le Clec'h, C., Moisan, A., Bräuer-Krisch, E., Leduc, G., Rémy, C., Laissue, J.A., Barbier, E.L., Brun, E., Serduc, R. (2013a). Synchrotron microbeam radiation therapy induces hypoxia in intracerebral gliosarcoma but not in the normal brain. *Radiother. Oncol.* 108, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.05.013>
- Bouchet, A., Lemasson, B., Le Duc, G., Maisin, C., Bräuer-Krisch, E., Siegbahn, E.A., Renaud, L., Khalil, E., Rémy, C., Poillot, C., Bravin, A., Laissue, J.A., Barbier, E.L., Serduc, R. (2010). Preferential Effect of Synchrotron Microbeam Radiation Therapy on Intracerebral 9L Gliosarcoma Vascular Networks. *Int. J. Radiat. Oncol.* 78, 1503–1512. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.06.021>
- Bouchet, A., Sakakini, N., El Atifi, M., Le Clec'h, C., Brauer, E., Moisan, A., Deman, P., Rihet, P., Le Duc, G., Pelletier, L. (2013b). Early Gene Expression Analysis in 9L Orthotopic Tumor-Bearing Rats Identifies Immune Modulation in Molecular Response to Synchrotron Microbeam Radiation Therapy. *PLoS ONE* 8, e81874.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081874>
- Bouchet, A., Serduc, R., Laissue, J.A., Djonov, V. (2015). Effects of microbeam radiation therapy on normal and tumoral blood vessels. *Phys. Med.* 31, 634–641.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2015.04.014>
- Bräuer-Krisch, E., Adam, J.-F., Alagoz, E., Bartsch, S., Crosbie, J., DeWagter, C., Dipuglia, A., Donzelli, M., Doran, S., Fournier, P., Kalef-Ezra, J., Kock, A., Lerch, M., McErlean, C., Oelfke, U., Olko, P., Petasecca, M., Povoli, M., Rosenfeld, A., Siegbahn, E.A., Sporea, D., Stugu, B. (2015). Medical physics aspects of the synchrotron radiation therapies: Microbeam radiation therapy (MRT) and synchrotron

- stereotactic radiotherapy (SSRT). *Phys. Med.* 31, 568–583.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2015.04.016>
- Bräuer-Krisch, E., Requardt, H., Régnard, P., Corde, S., Siegbahn, E., LeDuc, G., Brochard, T., Blattmann, H., Laissue, J., Bravin, A. (2005). New irradiation geometry for microbeam radiation therapy. *Phys. Med. Biol.* 50, 3103–3111.
<https://doi.org/10.1088/0031-9155/50/13/009>
- Bundesamt für Strahlenschutz (2020, September 18). Biologische Dosimetrie nach einer Strahlenexposition.
<https://www.bfs.de/DE/themen/ion/service/dosimetrie/biologische-dosimetrie/biologische-dosimetrie.html>
- Cheong, H.S.J., Seth, I., Joiner, M.C., Tucker, J.D. (2013). Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* 28, 433–440.
<https://doi.org/10.1093/mutage/get020>
- Collins, P.L., Purman, C., Porter, S.I., Nganga, V., Saini, A., Hayer, K.E., Gurewitz, G.L., Sleckman, B.P., Bednarski, J.J., Bassing, C.H., Oltz, E.M. (2020). DNA double-strand breaks induce H2Ax phosphorylation domains in a contact-dependent manner. *Nat. Commun.* 11, 3158. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16926-x>
- Daguenet, E., Louati, S., Wozny, A.-S., Vial, N., Gras, M., Guy, J.-B., Vallard, A., Rodriguez-Lafrasse, C., Magné, N. (2020). Radiation-induced bystander and abscopal effects: important lessons from preclinical models. *Br. J. Cancer* 123, 339–348.
<https://doi.org/10.1038/s41416-020-0942-3>
- de Feraudy, S., Revet, I., Bezrookove, V., Feeney, L., Cleaver, J.E. (2010). A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of γ H2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 6870–6875.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1002175107>
- Denekamp, J. (1990). Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer. *CANCER METASTASIS Rev.* 9, 267–282. <https://doi.org/10.1007/BF00046365>
- Dickey, J.S., Baird, B.J., Redon, C.E., Sokolov, M.V., Sedelnikova, O.A., Bonner, W.M. (2009). Intercellular communication of cellular stress monitored by γ -H2AX induction. *Carcinogenesis* 30, 1686–1695. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp192>
- Dilmanian, F.A., Button, T.M., Le Duc, G., Zhong, N., Peña, L.A., Smith, J.A.L., Martinez, S.R., Bacarian, T., Tammam, J., Ren, B., Farmer, P.M., Kalef-Ezra, J., Micca, P.L., Nawrocky, M.M., Niederer, J.A., Recksiek, F.P., Fuchs, A., Rosen, E.M. (2002). Response of rat intracranial 9L gliosarcoma to microbeam radiation therapy. *Neuro-Oncol.* 4, 26–38. <https://doi.org/10.1093/neuonc/4.1.26>
- Dilmanian, F.A., Morris, G.M., Le Duc, G., Huang, X., Ren, B., Bacarian, T., Allen, J.C., Kelef-Ezra, J., Orion, I., Rosen, E.M., Sandhu, T., Sathé, P., Wu, X.Y., Zhong, Z., Shivaprasad, H.L. (2001). Response of avian embryonic brain to spatially segmented X-ray microbeams. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 47, 485–493.
- Dilmanian, F.A., Morris, G.M., Zhong, N., Bacarian, T., Hainfeld, J.F., Kalef-Ezra, J., Brewington, L.J., Tammam, J., Rosen, E.M. (2003). Murine EMT-6 Carcinoma: High Therapeutic Efficacy of Microbeam Radiation Therapy. *Radiat. Res.* 159, 632–641.
[https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2003\)159\[0632:MECHTE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0632:MECHTE]2.0.CO;2)
- 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.
<https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.11>
- Engels, E., Li, N., Davis, J., Paino, J., Cameron, M., Dipuglia, A., Vogel, S., Valceski, M., Khochaiche, A., O’Keefe, A., Barnes, M., Cullen, A., Stevenson, A., Guatelli, S., Rosenfeld, A., Lerch, M., Corde, S., Tehei, M. (2020). Toward personalized

- synchrotron microbeam radiation therapy. *Sci. Rep.* 10, 8833.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-65729-z>
- Ernst Schmid, T., Zlobinskaya, Olga., Multhoff, G. (2012). Differences in Phosphorylated Histone H2AX Foci Formation and Removal of Cells Exposed to Low and High Linear Energy Transfer Radiation. *Curr. Genomics* 13, 418–425.
<https://doi.org/10.2174/138920212802510501>
- Esplen, N.M., Chergui, L., Johnstone, C.D., Bazalova-Carter, M. (2018). Monte Carlo optimization of a microbeam collimator design for use on the small animal radiation research platform (SARRP). *Phys. Med. Biol.* 63, 175004.
<https://doi.org/10.1088/1361-6560/aad7e2>
- Fabbrizi, M.R., Warshowsky, K.E., Zobel, C.L., Hallahan, D.E., Sharma, G.G. (2018). Molecular and epigenetic regulatory mechanisms of normal stem cell radiosensitivity. *Cell Death Discov.* 4, 117. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0132-8>
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2, 1084–1104.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
- Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 534, 65-75.
[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00249-8)
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26, 125–132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>
- Fernandez-Palomo, C., Schültke, E., Bräuer-Krisch, E., Laissue, J.A., Blattmann, H., Seymour, C., Mothersill, C. (2016). Investigation of Abscopal and Bystander Effects in Immunocompromised Mice After Exposure to Pencilbeam and Microbeam Synchrotron Radiation. *Health Phys.* 111, 149–159.
<https://doi.org/10.1097/HP.0000000000000525>
- Fukunaga, H., Butterworth, K.T., McMahon, S.J., Prise, K.M. (2021). A Brief Overview of the Preclinical and Clinical Radiobiology of Microbeam Radiotherapy. *Clin. Oncol.* 33, 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2021.08.011>
- Fukunaga, H., Kaminaga, K., Sato, T., Butterworth, K.T., Watanabe, R., Usami, N., Ogawa, T., Yokoya, A., Prise, K.M. (2019). High-precision microbeam radiotherapy reveals testicular tissue-sparing effects for male fertility preservation. *Sci. Rep.* 9, 12618.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48772-3>
- Ghaderi, N., Jung, J., Brüningk, S.C., Subramanian, A., Nassour, L., Peacock, J. (2022). A Century of Fractionated Radiotherapy: How Mathematical Oncology Can Break the Rules. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1316. <https://doi.org/10.3390/ijms23031316>
- Grotzer, M.A., Schültke, E., Bräuer-Krisch, E., Laissue, J.A. (2015). Microbeam radiation therapy: Clinical perspectives. *Phys. Med., Radiation Therapy with Synchrotron Radiation: Achievements and Challenges* 31, 564–567.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2015.02.011>
- Han, W., Wu, L., Chen, S., Bao, L., Zhang, L., Jiang, E., Zhao, Y., Xu, A., Hei, T.K., Yu, Z. (2007). Constitutive nitric oxide acting as a possible intercellular signaling molecule in the initiation of radiation-induced DNA double strand breaks in non-irradiated bystander cells. *Oncogene* 26, 2330–2339. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210024>
- Hei, T.K., Zhou, H., Chai, Y., Ponnaiya, B., Ivanov, V.N. (2011). Radiation Induced Non-targeted Response: Mechanism and Potential Clinical Implications. *Curr. Mol. Pharmacol.* 4, 96–105. <https://doi.org/10.2174/1874467211104020096>

- Hoffelder, D.R., Luo, L., Burke, N.A., Watkins, S.C., Gollin, S.M., Saunders, W.S. (2004). Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma* 112, 389–397. <https://doi.org/10.1007/s00412-004-0284-6>
- Horn, S., Brady, D., Prise, K. (2015). Alpha particles induce pan-nuclear phosphorylation of H2AX in primary human lymphocytes mediated through ATM. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1853, 2199–2206. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.06.010>
- Huber, R., Schraube, H., Nahrstedt, U., Braselmann, H., Bauchinger, M. (1994). Dose-response relationships of micronuclei in human lymphocytes induced by fission neutrons and by low LET radiations. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 306, 135–141. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90024-8)
- Ibahim, M.J., Crosbie, J.C., Yang, Y., Zaitseva, M., Stevenson, A.W., Rogers, P.A.W., Paiva, P. (2014). An Evaluation of Dose Equivalence between Synchrotron Microbeam Radiation Therapy and Conventional Broadbeam Radiation Using Clonogenic and Cell Impedance Assays. *PLoS ONE* 9, e100547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100547>
- Laissue, J., Blattmann, H., Wagner, H.P., Grotzer, M.A., Slatkin, D.N. (2007). Prospects for microbeam radiation therapy of brain tumours in children to reduce neurological sequelae. *Dev. Med. Child Neurol.* 49, 577–581. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2007.00577.x>
- Laissue, J.A., Geiser, G., Spanne, P.O., Dilmanian, F.A., Gebbers, J.-O., Geiser, M., Wu, X.-Y., Makar, M.S., Micca, P.L., Nawrocky, M.M., Joel, D.D., Slatkin, D.N. (1998). Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated X rays. *Int. J. Cancer* 78, 654–660. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19981123\)78:5<654::AID-IJC21>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19981123)78:5<654::AID-IJC21>3.0.CO;2-L)
- Lamkowski, A., Forcheron, F., Agay, D., Ahmed, E.A., Drouet, M., Meineke, V., Scherthan, H. (2014). DNA Damage Focus Analysis in Blood Samples of Minipigs Reveals Acute Partial Body Irradiation. *PLoS ONE* 9, e87458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087458>
- Le Hégarat, L., Fessard, V., Poul, J.M., Dragacci, S., Sanders, P. (2004). Marine Toxin Okadaic Acid Induces Aneuploidy in CHO-K1 Cells in Presence of Rat Liver Postmitochondrial Fraction, Revealed by Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Coupled to FISH. *Environ. Toxicol.* 19, 123–128. <https://doi.org/10.1002/tox.20004>
- Lomax, M.E., Folkes, L.K., O'Neill, P. (2013). Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clin. Oncol.* 25, 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2013.06.007>
- Lonati, L., Barbieri, S., Guardamagna, I., Ottolenghi, A., Baiocco, G. (2021). Radiation-induced cell cycle perturbations: a computational tool validated with flow-cytometry data. *Sci. Rep.* 11, 925. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79934-3>
- Loucas, B.D., Cornforth, M.N. (2001). Complex Chromosome Exchanges Induced by Gamma Rays in Human Lymphocytes: An mFISH Study. *Radiat. Res.* 155, 660–671. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2001\)155\[0660:CCEIBG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2001)155[0660:CCEIBG]2.0.CO;2)
- Lusiyanti, Y., Alatas, Z., Syaifudin, M., Purnami, S. (2016). Establishment of a Dose-response Curve for X-ray-Induced Micronuclei in Human Lymphocytes. *Genome Integr.* 7. <https://doi.org/10.4103/2041-9414.197162>
- Marková, E., Schultz, N., Belyaev, I.Y. (2007). Kinetics and dose-response of residual 53BP1/γ-H2AX foci: Co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *Int. J. Radiat. Biol.* 83, 319–329. <https://doi.org/10.1080/09553000601170469>

- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 88, 1515–1531. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.004>
- Matthaios, D., Foukas, P.G., Kefala, M., Hountis, P., Trypsianis, G., Panayiotides, I.G., Chatzaki, E., Pantelidaki, E., Bouros, D., Karakitsos, P., Kakolyris, S. (2012). γ -H2AX expression detected by immunohistochemistry correlates with prognosis in early operable non-small cell lung cancer. *OncoTargets Ther.* 5, 309–314. <https://doi.org/10.2147/OTT.S36995>
- Meyer, B., Voss, K.-O., Tobias, F., Jakob, B., Durante, M., Taucher-Scholz, G. (2013). Clustered DNA damage induces pan-nuclear H2AX phosphorylation mediated by ATM and DNA-PK. *Nucleic Acids Res.* 41, 6109–6118. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt304>
- Mirza-Aghazadeh-Attari, M., Mohammadzadeh, A., Yousefi, B., Mihanfar, A., Karimian, A., Majidinia, M. (2019). 53BP1: A key player of DNA damage response with critical functions in cancer. *DNA Repair* 73, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.11.008>
- Moeglin, E., Desplancq, D., Conic, S., Oulad-Abdelghani, M., Stoessel, A., Chiper, M., Vigneron, M., Didier, P., Tora, L., Weiss, E. (2019). Uniform Widespread Nuclear Phosphorylation of Histone H2AX Is an Indicator of Lethal DNA Replication Stress. *Cancers* 11, 355. <https://doi.org/10.3390/cancers11030355>
- Montay-Gruel, P., Acharya, M.M., Jorge, P.G., Petit, B., Petridis, I.G., Fuchs, P., Leavitt, R., Petersson, K., Gondre, M., Ollivier, J., Moeckli, R., Bochud, F., Bailat, C., Bourhis, J., Germond, J.-F., Limoli, C.L., Vozenin, M.-C. (2021). Hypo-fractionated FLASH-RT: An effective treatment against glioblastoma that significantly reduces neurocognitive side effects in mice. *Clin. Cancer Res.* 27, 775–784. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0894>
- Mukumoto, N., Nakayama, M., Akasaka, H., Shimizu, Y., Osuga, S., Miyawaki, D., Yoshida, K., Ejima, Y., Miura, Y., Umetani, K., Kondoh, T., Sasaki, R. (2017). Sparing of tissue by using micro-slit-beam radiation therapy reduces neurotoxicity compared with broad-beam radiation therapy. *J. Radiat. Res.* 58, 17–23. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrw065>
- Nagasawa, H., Little, J.B. (1999). Unexpected Sensitivity to the Induction of Mutations by Very Low Doses of Alpha-Particle Radiation: Evidence for a Bystander Effect. *Radiat. Res.* 152, 552–557. <https://doi.org/10.2307/3580153>
- Nagasawa, H., Little, J.B. (1992). Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res.* 52, 6394–6396.
- Neumaier, T., Swenson, J., Pham, C., Polyzos, A., Lo, A.T., Yang, P., Dyball, J., Asaithamby, A., Chen, D.J., Bissell, M.J., Thalhammer, S., Costes, S.V. (2012). Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 443–448. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117849108>
- OECD (2021). Test Guideline No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Methods, in: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>
- OECD (2019). Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method, in: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264618-en>
- OECD (2016). Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, in: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264861-en>

- Pelliccioli, P., Bartzsch, S., Donzelli, M., Krisch, M., Bräuer-Krisch, E. (2019). High resolution radiochromic film dosimetry: Comparison of a microdensitometer and an optical microscope. *Phys. Med.* 65, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2019.08.012>
- Phenion (2014). *epics-manual-phenion*. Retrieved November 2, 2022, from <https://www.henkel.com/resource/blob/1101372/d55762072db0ed86673912f75a2c62cd/data/epics-manual-phenion-v20-10.pdf>
- Prezado, Y., Dos Santos, M., Gonzalez, W., Jouvion, G., Guardiola, C., Heinrich, S., Labiod, D., Juchaux, M., Jourdain, L., Sebrie, C., Pouzoulet, F. (2017). Transfer of Minibeam Radiation Therapy into a cost-effective equipment for radiobiological studies: a proof of concept. *Sci. Rep.* 7, 17295. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17543-3>
- Prise, K.M., O'Sullivan, J.M. (2009). Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 9, 351–360. <https://doi.org/10.1038/nrc2603>
- Redon, C.E., Dickey, J.S., Bonner, W.M., Sedelnikova, O.A. (2009). γ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Adv. Space Res.* 43, 1171–1178. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2008.10.011>
- Ricoul, M., Gnana-Sekaran, T., Piqueret-Stephan, L., Sabatier, L. (2017). Cytogenetics for Biological Dosimetry, in: Wan, T.S.K. (Ed.), *Cancer Cytogenetics, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 189–208. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6703-2_17
- Rodney Withers, H., Taylor, J.M.G., Maciejewski, B. (1988). Treatment volume and tissue tolerance. *Int. J. Radiat. Oncol.* 14, 751–759. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(88\)90098-3](https://doi.org/10.1016/0360-3016(88)90098-3)
- Rodrigues, M.A., Beaton-Green, L.A., Wilkins, R.C., Fenech, M.F. (2018). The potential for complete automated scoring of the cytokinesis block micronucleus cytome assay using imaging flow cytometry. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 836, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.05.003>
- Romm, H., Wilkins, R.C., Coleman, C.N., Lillis-Hearne, P.K., Pellmar, T.C., Livingston, G.K., Awa, A.A., Jenkins, M.S., Yoshida, M.A., Oestreicher, U., Prasanna, P.G.S. (2011). Biological Dosimetry by the Triage Dicentric Chromosome Assay: Potential Implications for Treatment of Acute Radiation Syndrome in Radiological Mass Casualties. *Radiat. Res.* 175, 397–404. <https://doi.org/10.1667/RR2321.1>
- Rothkamm, K., Crosbie, J.C., Daley, F., Bourne, S., Barber, P.R., Vojnovic, B., Cann, L., Rogers, P.A.W. (2012). In situ Biological Dose Mapping Estimates the Radiation Burden Delivered to ‘Spared’ Tissue between Synchrotron X-Ray Microbeam Radiotherapy Tracks. *PLoS ONE* 7, e29853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029853>
- Safari, F., Akbari, B. (2022). Knockout of caspase-7 gene improves the expression of recombinant protein in CHO cell line through the cell cycle arrest in G2/M phase. *Biol. Res.* 55, 2. <https://doi.org/10.1186/s40659-021-00369-9>
- Santivasi, W.L., Xia, F. (2014). Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, Response, and Repair. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 251–259. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5668>
- Scherthan, H., Wagner, S.-Q., Grundhöfer, J., Matejka, N., Müller, J., Müller, S., Rudigkeit, S., Sammer, M., Schoof, S., Port, M., Reindl, J. (2022). Planar Proton Minibeam Irradiation Elicits Spatially Confined DNA Damage in a Human Epidermis Model. *Cancers* 14, 1545. <https://doi.org/10.3390/cancers14061545>
- Schmid, T.E., Dollinger, G., Hauptner, A., Hable, V., Greubel, C., Auer, S., Friedl, A.A., Molls, M., Röper, B. (2009). No Evidence for a Different RBE between Pulsed and Continuous 20 MeV Protons. *Radiat. Res.* 172, 567–574. <https://doi.org/10.1667/RR1539.1>

- Schültke, E., Balosso, J., Breslin, T., Cavaletti, G., Djonov, V., Esteve, F., Grotzer, M., Hildebrandt, G., Valdman, A., Laissue, J. (2017). Microbeam radiation therapy — grid therapy and beyond: a clinical perspective. *Br. J. Radiol.* 90, 20170073. <https://doi.org/10.1259/bjr.20170073>
- Scully, R., Xie, A. (2013). Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat. Res.* 750, 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.07.007>
- Sedelnikova, O.A., Nakamura, A., Kovalchuk, O., Koturbash, I., Mitchell, S.A., Marino, S.A., Brenner, D.J., Bonner, W.M. (2007). DNA Double-Strand Breaks Form in Bystander Cells after Microbeam Irradiation of Three-dimensional Human Tissue Models. *Cancer Res.* 67, 4295–4302. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4442>
- Serduc, R., Bouchet, A., Bräuer-Krisch, E., Laissue, J.A., Spiga, J., Sarun, S., Bravin, A., Fonta, C., Renaud, L., Boutonnat, J., Siegbahn, E.A., Estève, F., Le Duc, G. (2009). Synchrotron microbeam radiation therapy for rat brain tumor palliation—influence of the microbeam width at constant valley dose. *Phys. Med. Biol.* 54, 6711–6724. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/54/21/017>
- Serduc, R., Vérant, P., Vial, J.-C., Farion, R., Rocas, L., Rémy, C., Fadlallah, T., Brauer, E., Bravin, A., Laissue, J., Blattmann, H., van der Sanden, B. (2006). In vivo two-photon microscopy study of short-term effects of microbeam irradiation on normal mouse brain microvasculature. *Int. J. Radiat. Oncol.* 64, 1519–1527. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.11.047>
- Shao, C., Folkard, M., Michael, B.D., Prise, K.M. (2004). Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13495–13500. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404930101>
- Slatkin, D.N., Spanne, P., Dilmanian, F.A., Gebbers, J.O., Laissue, J.A. (1995). Subacute neuropathological effects of microplanar beams of x-rays from a synchrotron wiggler. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 8783–8787. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8783>
- Slatkin, D.N., Spanne, P., Dilmanian, F.A., Sandborg, M. (1992). Microbeam radiation therapy. *Med. Phys.* 19, 1395–1400. <https://doi.org/10.1118/1.596771>
- Smyth, L.M.L., Senthil, S., Crosbie, J.C., Rogers, P.A.W. (2016). The normal tissue effects of microbeam radiotherapy: What do we know, and what do we need to know to plan a human clinical trial? *Int. J. Radiat. Biol.* 92, 302–311. <https://doi.org/10.3109/09553002.2016.1154217>
- Soloneski, S., Kujawski, M., Scuto, A., Larramendy, M.L. (2015). Carbamates: A study on genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects induced in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Toxicol. In Vitro* 29, 834–844. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.03.011>
- Sprung, C.N., Yang, Y., Forrester, H.B., Li, J., Zaitseva, M., Cann, L., Restall, T., Anderson, R.L., Crosbie, J.C., Rogers, P.A.W. (2012). Genome-Wide Transcription Responses to Synchrotron Microbeam Radiotherapy. *Radiat. Res.* 178, 249. <https://doi.org/10.1667/RR2885.1>
- Steinmeyer, L., Ochs, A., Thiede, B., Fuchs, H., Petersohn, D., Mewes, K.R. (2022). Performance assessment of the epiCS® epidermal model after technology transfer to a new production site. *Euro Cosmetics* 30, 20–25. Retrieved August 8, 2022, from <https://www.henkel.com/resource/blob/1695480/e99e54272b56435c5425dd8d9542a2fc/data/manuscript-epics-2022.pdf>
- Su, Y., Meador, J.A., Geard, C.R., Balajee, A.S. (2010). Analysis of ionizing radiation-induced DNA damage and repair in three-dimensional human skin model system. *Exp. Dermatol.* 19, e16–e22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00945.x>
- Suzuki, K., Nakashima, M., Yamashita, S. (2010). Dynamics of Ionizing Radiation-Induced DNA Damage Response in Reconstituted Three-Dimensional Human Skin Tissue. *Radiat. Res.* 174, 415–423. <https://doi.org/10.1667/RR2007.1>

- Swartz, H.M., Williams, B.B., Flood, A.B. (2014). Overview of the principles and practice of biodosimetry. *Radiat. Environ. Biophys.* 53, 221–232. <https://doi.org/10.1007/s00411-014-0522-0>
- Tian, X.-L., Zhao, H., Cai, T.-J., Lu, X., Chen, D.-Q., Li, S., Liu, Q.-J. (2016). Dose–effect relationships of nucleoplasmic bridges and complex nuclear anomalies in human peripheral lymphocytes exposed to ^{60}Co γ -rays at a relatively low dose. *Mutagenesis* 31, 425–431. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew001>
- Treibel, F., Nguyen, M., Ahmed, M., Dombrowsky, A., Wilkens, J.J., Combs, S.E., Schmid, T.E., Bartzsch, S. (2021). Establishment of Microbeam Radiation Therapy at a Small-Animal Irradiator. *Int. J. Radiat. Oncol.* 109, 626–636. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2020.09.039>
- Uyama, A., Kondoh, T., Nariyama, N., Umetani, K., Fukumoto, M., Shinohara, K., Kohmura, E. (2011). A narrow microbeam is more effective for tumor growth suppression than a wide microbeam: an *in vivo* study using implanted human glioma cells. *J. Synchrotron Radiat.* 18, 671–678. <https://doi.org/10.1107/S090904951101185X>
- Ward, J.F. (1994). DNA Damage as the Cause of Ionizing Radiation-Induced Gene Activation. *Radiat. Res.* 138, S85. <https://doi.org/10.2307/3578769>
- White, J., Stead, E., Faast, R., Conn, S., Cartwright, P., Dalton, S. (2005). Developmental Activation of the Rb–E2F Pathway and Establishment of Cell Cycle-regulated Cyclin-dependent Kinase Activity during Embryonic Stem Cell Differentiation. *Mol. Biol. Cell* 16, 2018–2027. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-12-1056>
- Williams, M., Metcalfe, P. (2011). Radiochromic Film Dosimetry and its Applications in Radiotherapy. *AIP Conf Proc* 1345, 75–99. <https://doi.org/10.1063/1.3576160>
- Wong, E.T., Lok, E., Swanson, K.D. (2015). An Evidence-Based Review of Alternating Electric Fields Therapy for Malignant Gliomas. *Curr. Treat. Options Oncol.* 16, 40. <https://doi.org/10.1007/s11864-015-0353-5>
- Wood, K., Whitney, B., Bjorkman, J., Wolff, M. (2013, July). Introduction to Monte Carlo Radiation Transfer. Retrieved December 17, 2022, from <http://www-star.st-and.ac.uk/~kw25/research/montecarlo/book.pdf>
- Xu, N., Ma, C., Ou, J., Sun, W.W., Zhou, L., Hu, H., Liu, X.M. (2017). Comparative proteomic analysis of three Chinese hamster ovary (CHO) host cells. *Biochem. Eng. J.* 124, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.05.007>
- Yang, Y., Crosbie, J.C., Paiva, P., Ibahim, M., Stevenson, A., Rogers, P.A.W. (2014). In Vitro Study of Genes and Molecular Pathways Differentially Regulated by Synchrotron Microbeam Radiotherapy. *Radiat. Res.* 182, 626. <https://doi.org/10.1667/RR13778.1>
- Yang, Y., Swierczak, A., Ibahim, M., Paiva, P., Cann, L., Stevenson, A.W., Crosbie, J.C., Anderson, R.L., Rogers, P.A.W. (2019). Synchrotron microbeam radiotherapy evokes a different early tumor immunomodulatory response to conventional radiotherapy in EMT6.5 mammary tumors. *Radiother. Oncol.* 133, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.01.006>
- Zhang, Z., Li, K., Hong, M. (2022). Radiation-Induced Bystander Effect and Cytoplasmic Irradiation Studies with Microbeams. *Biology* 11, 945. <https://doi.org/10.3390/biology11070945>
- Zhong, N., Morris, G.M., Bacarian, T., Rosen, E.M., Dilmanian, F.A. (2003). Response of Rat Skin to High-Dose Unidirectional X-Ray Microbeams: A Histological Study. *Radiat. Res.* 160, 133–142. <https://doi.org/10.1667/3033>
- Zlobinskaya, O., Girst, S., Greubel, C., Hable, V., Siebenwirth, C., Walsh, D.W.M., Multhoff, G., Wilkens, J.J., Schmid, T.E., Dollinger, G. (2013). Reduced side effects by proton microchannel radiotherapy: study in a human skin model. *Radiat. Environ. Biophys.* 52, 123–133. <https://doi.org/10.1007/s00411-012-0450-9>

Danksagung

Zunächst möchte ich mich gerne bei Prof. Dr. Thomas Schmid bedanken für seine konstante und kompetente Betreuung, fachliche Unterstützung und ständige Erreichbarkeit.

Ich bedanke mich bei allen, die bei meiner Arbeit beteiligt waren und mich dabei unterstützt haben. Besonders danke ich:

- Dr. Annique Dombrowsky, die mir alle nötigen Techniken im Labor beigebracht hat, mich durch das Projekt geführt hat und mir ständig bei allen Experimenten und allen möglichen Fragen geholfen hat.
- Dr. Stefan Bartzsch für die tatkräftige Unterstützung und Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse und Dosimetrie.
- Prof. Harry Scherthan, Jessica Müller, Steffen Müller, Lisa Marie Fees und Sarah Schoof der Bundeswehr für die unersetzbare Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente mit dem Hautgewebe.
- Sandra Bicher und Dr. Marina Di Franco, die mir stets mit einem wertvollen Ratschlag und Hilfe sowohl im Labor als auch bei der Auswertung zur Seite standen.
- Franziska Treibel, Mabroor Ahmed und Rainer Lindner für die hilfreiche Unterstützung bei Fragen rund um die Physik und Dosimetrie.

Insgesamt möchte ich mich für die sehr schöne Zeit, in der ich viel dazu gelernt habe und die emotionale Unterstützung der ganzen Arbeitsgruppe bedanken.

Meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, möchte ich für das Verständnis über die gesamte Zeit und die seelische Unterstützung danken.