

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. B. J. Krause

**In-Vitro-Untersuchungen zu Dosis-Wirkungsbeziehungen bei [¹⁷⁷Lu]Lu-
PSMA-617-Therapie in humanen Prostatakarzinomzelllinien**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Sophia Maurer, geb. am 25.08.1995, in München

aus Regensburg

Rostock, 2022

Dekan: Prof. Dr. med. univ. E. C. Reisinger

1. Gutachter: Krause, Bernd Joachim, Klinik und Polyklinik für Nuklearmedizin -
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Brenner, Winfried, Klinik für Nuklearmedizin Charité -
Universitätsmedizin Berlin

3. Gutachter: Vollmar, Brigitte, Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie -
Universitätsmedizin Rostock

Jahr der Einreichung: 2022

Jahr der Verteidigung: 2023

1 Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
2	Grundlagen	10
2.1	Prostatakarzinom.....	10
2.1.1	Diagnostik.....	10
2.1.2	Therapie.....	11
2.2	Prostatakarzinomzelllinien.....	12
2.2.1	LNCaP-Zelllinie.....	12
2.2.2	PC3-Zelllinie.....	13
2.2.3	In-vitro-Zellwachstum.....	14
2.3	Prostata-spezifisches Membranantigen.....	14
2.4	PSMA-Liganden.....	16
2.5	Endozytose.....	16
2.6	Dosimetrie.....	17
2.6.1	Dosisbegriffe.....	17
2.6.2	MIRD-Formalismus.....	17
2.6.3	Effektive Halbwertszeit.....	19
2.6.4	Zelluläre S-Werte.....	19
2.6.5	S-Werte für [¹⁷⁷ Lu]Lutetium.....	21
2.6.6	[¹⁷⁷ Lu]Lutetium.....	24
2.6.7	RADAR-Formalismus.....	24
2.7	Strahlenbiologie.....	25
2.7.1	Biologische Wirkung ionisierender Strahlung auf die Zelle.....	25
2.7.2	Wirkung ionisierender Strahlung auf den Organismus.....	28
2.8	Therapieschema der [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-Therapie.....	29
3	Zielsetzung	32
4	Materialien und Methoden	35
4.1	Materialien.....	35
4.1.1	Zelllinien.....	35
4.1.2	Kulturmedium und Zusätze.....	35
4.1.3	Radiopharmaka.....	35
4.1.4	Chemikalien.....	39
4.1.5	Gebrauchsmaterialien.....	39

4.1.6	Geräte.....	40
4.1.7	Software.....	41
4.1.8	Posttherapeutische Aufnahmeparameter der Patientenstudien	41
4.2	Methoden	42
4.2.1	Zellkultur	42
4.2.2	Zellzählung	43
4.2.3	Gamma-Counter Messungen	44
4.2.4	Durchflusszytometrie.....	45
4.2.5	Allgemeines zum Versuchssetup aller Versuche.....	46
4.2.6	Aufnahme-Versuche	46
4.2.7	Bindungsspezifität und Internalisierung	47
4.2.8	Durchflusszytometrie zur Evaluation einsetzender Apoptose nach Inkubation mit [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617.....	48
4.2.9	Vitalitätsbestimmung mittels [¹⁸ F]FLT	48
4.2.10	Dosisberechnung basierend auf zellulären Aufnahmeversuchen	49
4.2.11	Dosisberechnung für eine Metastase im Patienten	51
4.2.12	Zelldichte	52
4.2.13	Näherung einer in-vivo-Dosis aus in-vitro-Daten	54
5	Ergebnisse.....	55
5.1	Zusammenfassung und Bewertung der Vorversuche.....	55
5.2	Ergebnisse der Vorversuche, welche die Grundlage zur Durchführung der Hauptversuche darstellten	58
5.3	Aufnahmekinetik.....	59
5.4	Bindungsspezifität und Internalisierungskinetik.....	66
5.5	Dosis-Wirkungs-Beziehungen	68
5.5.1	Zellüberlebenskurven.....	68
5.5.2	Durchflusszytometrie zur Evaluation einsetzender Apoptose nach Bestrahlung mit [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617.....	72
5.5.3	Vitalitätsbestimmung mittels [¹⁸ F]FLT	73
5.6	Dosisberechnung basierend auf den zellulären Aufnahmeversuchen	75
5.7	Dosisberechnung für eine Metastase im Patienten.....	78
5.7.1	Weichteilmetastase	78
5.7.2	Knochenmetastase	79
5.8	Näherung einer in-vivo-Dosis aus in-vitro-Daten.....	80
6	Diskussion	83
6.1	Aufnahmekinetik, Bindungsspezifität und subzelluläre Verteilung der Radiopharmaka	86
6.2	Dosis-Wirkungs-Beziehungen	88

6.2.1	Zellüberleben	88
6.2.2	Proliferationsverhalten	90
6.2.3	Zellzyklusveränderungen nach Bestrahlung	91
6.3	Übertragbarkeit auf makroskopische Situation	92
7	Zusammenfassung.....	96
8	Ausblick	98
9	Thesen	101
10	Anhang.....	103
10.1	Literaturverzeichnis.....	103
10.2	Abbildungsverzeichnis.....	113
10.3	Tabellenverzeichnis.....	116
10.4	Vorversuche	119
10.4.1	Methoden	119
10.4.2	Ergebnisse	121
10.5	Ergänzende Ergebnisse der Hauptversuche mit PC3-Zellen	133
10.5.1	Bindungsspezifität und Internalisierungskinetik	133
10.5.2	Durchflusszytometrie zur Evaluation einsetzender Apoptose nach Bestrahlung mit [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617.....	135
10.5.3	Vitalitätsbestimmung mittels [¹⁸ F]FLT	136
10.6	Ergänzende Abbildungen	138
10.6.1	Auswertung der Durchflusszytometrie	138
10.6.2	Patientenstudien	140
10.7	Exemplarische Dosisberechnungen	142
10.8	Selbstständigkeitserklärung	145
10.9	Lebenslauf.....	146
10.10	Danksagung.....	147

1 Einleitung

Weltweit ist das Prostatakarzinom (PCa) mit 15% aller Krebserkrankungen des Mannes die zweithäufigste Tumorart (Schlemmer, 2008, Ferlay et al., 2015). In Deutschland liegt die Inzidenz des Prostatakarzinoms bei circa 32.000 Neuerkrankungen pro Jahr, etwa 11.000 Männer versterben im gleichen Zeitraum daran (Schlemmer, 2008). Trotz mitunter frühzeitig eingesetzter lokaler Therapiemaßnahmen kommt es immer wieder zur Metastasierung des Primärtumors. Zudem werden manche Prostatakarzinome erst im metastasierten Stadium erkannt (Cathomas, Steuber und Gillissen, 2013).

Die verschiedenen Behandlungsansätze für die Therapie des Prostatakarzinoms sind in der S3-Leitlinie Prostatakarzinom zusammengefasst (Haring, Andrea, 2021). Dabei wird je nach Stadium lokalthérapeutisch primär operativ, strahlentherapeutisch oder antiandrogen behandelt. Bei Progress ist die Androgenablation die Therapie der Wahl. Kommt es auch unter dieser zu einem weiteren Fortschreiten der Erkrankung, spricht man vom kastrationsresistenten Prostatakarzinom (CRPC). Seit 2004 gehört die Chemotherapie mit Docetaxel zu dessen etablierter Therapieform. Inzwischen gibt es eine Vielzahl weiterer möglicher Behandlungsmethoden wie z.B. neue antihormonelle Therapien (Ernst-Günther Carl et al., 2018). Seit der Überarbeitung der S3-Leitlinie Prostatakarzinom 2018 ist eine weitere palliative Therapieoption hinzugekommen – eine Variante sogenannter Radioligandentherapien. „Für Patienten mit kastrationsresistenter, progredienter Erkrankung in gutem Allgemeinzustand kann nach Ausschöpfen der empfohlenen Therapieoptionen ein Therapieversuch mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA auf Basis der Empfehlung einer interdisziplinären Tumorkonferenz angeboten werden“ (Haring, Andrea, 2021). Hierbei handelt es sich um eine Therapieoption im Rahmen der Ausübung der ärztlichen Heilkunde mit dem Radiopharmakon [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA bei bis dato Fehlen eines zugelassenen Medikaments. Ziel ist es, das Prostataspezifische Membranantigen (PSMA), welches in vielen Tumorzellen überexprimiert vorliegt, mit einem Liganden in Bindung zu bringen und auf diesem Weg einen β -Strahler in unmittelbare Nähe der Tumorzellen zu deponieren (Mannweiler et al., 2009). Dazu wird der Ligand PSMA mit dem Reaktornuklid [¹⁷⁷Lu]Lutetium markiert. Zahlreiche Isotope des Lutetiums sind bekannt, von denen jedoch nur die Isotope [¹⁷⁵Lu]Lutetium und [¹⁷⁶Lu]Lutetium natürlich vorkommen (Banerjee, Pillai und Knapp, 2015).

Im Allgemeinen unterscheiden sich Radioligandentherapien (RLT) von strahlentherapeutischen Techniken nicht nur durch die eingesetzte Art der ionisierenden Strahlung und den daraus

resultierenden Therapierisiken für das umliegende Gewebe, sondern auch durch die zeitliche Abfolge der Interventionen. Anders als bei der Strahlentherapie sind die Zyklusintervalle durch Wochen bis Monate charakterisiert. Auch ist die angestrebte lokale Dosis in einem Zyklus bei der RLT bereits genauso hoch oder höher als die Gesamtdosis im Zielvolumen strahlentherapeutischer Interventionen. Die Therapie mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA kann bei Bedarf auf mehrere Zyklen ausgedehnt werden. Je nach Therapieprotokoll werden aktuell 4-6 Zyklen der RLT mit einem Abstand von 4-8 Wochen empfohlen (Fendler et al., 2016).

Die Erstbeschreibung des Prostataspezifischen Membranantigens durch Horoszewicz et al. im Jahre 1987 revolutionierte die Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms (Troyer, Beckett und Wright, JR, 1997). Die Arbeitsgruppe rund um Horoszewicz entwickelte den Antikörper 7E11.C5, welcher spezifisch an das PSMA der Epithelzellen der Prostata bindet. Die hohe Spezifität des Antikörpers führte schließlich zu Entwicklung des ProstaScint Tests, bei dem ein mit [¹²²In]Indium markierter monoklonaler Antikörper für eine anschließende Bildgebung mit SPECT zum Einsatz kommt (Taneja, 2004). In 90% der maligne entarteten Prostatazellen ist PSMA überexprimiert, wodurch sich diese Zellformationen besonders hervorheben. Mit dem ProstaScint Test konnten erstmalig okkulte Formen des Prostatakarzinoms der Bildgebung zugänglich gemacht werden (Holmes, 2001).

Die Entwicklung von PSMA-Liganden mit universellen Chelatoren wie DOTA, DOTAGA oder HBED-CC erlaubte die Herstellung der heute eingesetzten Radiopharmaka wie beispielsweise [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11, [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-I&T oder [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617. Zahlreiche Studien belegen inzwischen die Wirksamkeit und Sicherheit der auf diesen Radiopharmaka basierenden Therapien (Yadav et al., 2019). Nur in wenigen Fällen wurde von einer Toxizität 3./4. Grades berichtet. Bereits nach dem ersten Zyklus konnte bei 70% der Patienten ein für mindestens 8-10 Wochen anhaltender Abfall des PSA-Spiegels erreicht werden (Kratochwil et al., 2016a). Mitte 2021 wurden die Ergebnisse der klinischen Phase-III-Studie VISION-Trail der mit Frage nach dem therapeutische Nutzen im Hinblick auf das verlängerte Langzeitüberleben von CRPC-Patienten nach einer [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-Therapie publiziert (Sartor et al., 2021).

Die Wirkweise der [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-Therapie und deren Einfluss auf einzelne Tumorzellen ist jedoch noch nicht vollumfänglich erforscht. Um dieses Wissen zu generieren, muss ein Zusammenhang zwischen dem beobachteten Effekt, wie es Änderungen in der Zellwachstumskinetik, in Marker- oder Rezeptorkonzentration oder zunehmender Zelltod sein können, der applizierten [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-Dosis gegenübergestellt werden.

Ein wichtiges Konzept ist dabei die Zelldosimetrie, deren Aufgabe darin besteht, die Verbindung zwischen applizierter Aktivität und absorbierter Dosis auf zellulärer Ebene herzustellen und somit eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu generieren. Genaue Dosisbestimmungen sind essentiell, um Zusammenhänge zwischen der Dosis und ihrer Wirkung in allen Hierarchieebenen (Zelle, Gewebe Organ) zu beurteilen (Freudenberg, Wendisch und Kotzerke, 2011). Für die RLT ist die applizierte Dosis aufgrund einer sich zeitlich und räumlich stark ändernden Radiopharmakonverteilung mit stark variierenden Verweildauern in einzelnen Geweben (effektive Halbwertszeiten) weniger genau zu ermitteln, als es für die perkutane Bestrahlung möglich ist (Stabin, 2008). Sie ist jedoch essentiell für die Therapieplanung, um das therapeutische Fenster zwischen Ziel- und Normalgewebisdosis effizient auszunutzen und vermeidbare Toxizitäten zu erkennen.

Grundsätzlich kann bei der [^{177}Lu]Lu-PSMA-Therapie durch die spezifische Aufnahme des β -Strahlers [^{177}Lu]Lutetium in Tumorzellen eine maximale Dosis direkt im Tumorgewebe erreicht werden. Aufgrund der geringen Reichweite der β -Teilchen im Gewebe ($R_{\max} < 2 \text{ mm}$), wird das umliegende Gewebe durch eine vergleichsweise geringe Exposition geschont (H. Ilhan, C. la Fougère und B. J. Krause, 2020). Beim Zerfall von [^{177}Lu]Lutetium werden neben dem Tochternuklid [^{178}Hf]Hafnium, ein Elektron sowie ein Antineutrino frei. Das zunächst energiereiche Elektron ($E_{\beta, \max} = 498 \text{ keV}$) unterliegt auf seinem Weg durch die Zelle unterschiedlichen physikalischen Wechselwirkungen, bei denen es kontinuierlich seine Energie abgibt und die zu Folgeionisationsprozessen entlang seines Trackingpfades führen. Diese können unter anderem auch zu Strangbrüchen der DNA führen. In Abhängigkeit vom Schweregrad der DNA-Schäden wird entweder ein Zellzyklusarrest mit anschließendem Reparaturversuch der DNA oder der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet.

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung der [^{177}Lu]Lu-PSMA-617-Therapie auf zellulärer Ebene vergleichend für die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC3 anhand von Zellüberlebenskurven, der Evaluation der zellulären [^{18}F]FLT-Aufnahme sowie der Bestimmung des Zellzyklus untersucht. Mittels aus der Literatur bekannter zellulärer Dosimetriedaten wird begleitend eine Dosisabschätzung vorgenommen, sodass im Ergebnis zelluläre Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die [^{177}Lu]Lu-PSMA-617-Therapie diskutiert werden können. Mit der Untersuchung von sowohl den PSMA-exprimierenden LNCaP-Zellen, als auch den nicht-PSMA-exprimierenden PC3-Zellen, sollte je ein Modell zur Unterscheidung von in-situ- und ex-situ-Bestrahlung etabliert werden. Um zu überprüfen, ob die in den mikroskopischen in-vitro-Versuchsaufbauten gewählten Variablen mit den dazugehörigen

Ergebnissen einer mit den klinischen Gegebenheiten einer vergleichbaren makroskopischen Situation entsprechen, werden die in-vitro Ergebnisse mit Dosimetriestudien anhand zweier exemplarischer Patienten der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin Rostock verglichen.

2 Grundlagen

Beginnend bei der Darstellung der Klinik des Prostatakarzinoms werden anschließend die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien charakterisiert. Die für die RLT mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 relevante Zielstruktur, PSMA, wird neben einer Zusammenstellung von Endozytosemechanismen, welche der Internalisierung eines PSMA-Liganden, aber auch unspezifischer Komponenten zugrunde liegt, dargestellt. Nachfolgend werden für die Dosisberechnung relevante Begriffe und der MIRD-Formalismus eingeführt. Die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Zelle sowie deren Einfluss auf den gesamten Organismus wird im folgenden Abschnitt erläutert. Zuletzt wird auf mögliche Therapieschemen eingegangen.

2.1 Prostatakarzinom

2.1.1 Diagnostik

Aufgrund seines in der Regel symptomfreien Verlaufs im Frühstadium, bei gleichzeitig guter therapeutischer Prognose in dieser Phase, spielt die Früherkennung des PCas eine zentrale Rolle. Dazu gehört die digital-rektale Untersuchung, welche ab dem 45. Lebensjahr als Leistung aller Krankenkassen für jeden männlichen Patienten in Deutschland empfohlen wird. Zusätzlich wird eine Bestimmung des Serum-PSA-Spiegels vorgeschlagen. Das PSA (Prostata-spezifisches Antigen) ist eine Glykoprotein-Serin-Protease, welche in den Prostatadrüsen produziert wird und in geringen Konzentrationen im Blut zirkuliert. Seit seiner Entdeckung 1979 wird das PSA als Serummarker für das Prostatakarzinom verwendet (Müller-Lisse und Hofstetter, 2003). Eine Erhöhung des PSA-Spiegels kann jedoch eine Vielzahl von Ursachen haben wie ein zunehmendes Prostata-volumen bei benigner Prostatahyperplasie, ein Prostatakarzinom oder eine Entzündung der Prostata und ist somit kein eindeutiger Indikator für das Vorliegen eines PCas (Müller-Lisse und Hofstetter, 2003).

Oberhalb des Grenzwerts von 4 ng/ml PSA und /oder einem suspekten Tastbefund wird zunächst eine weiterführende Diagnostik in Form einer ultraschallgesteuerten Stanzbiopsie empfohlen (Börgermann, 2009). Dabei werden 10-12 Proben aus der peripheren Zone und karzinom-suspekten Herden entnommen. Zur Erweiterung der Primärdiagnostik kann zusätzlich ein MRT der Prostata (mpMRT) oder transrektaler Ultraschall erfolgen (Haring, Andrea, 2021). In der histologischen Aufarbeitung der entnommenen Proben wird die Drüsenmorphologie mittels Gleason-Score beurteilt. Dazu erfolgt eine Einteilung in fünf Grade, wobei mit Grad 1 gut differenzierte Tumore und mit Grad 5 schlecht differenzierte

Tumore beschrieben werden. Mit steigendem Gleason-Grad weicht das Wachstumsmuster stärker von der normalen Drüsenarchitektur ab. Dies geht mit einer verschlechterten Heilungsprognose einher. Aufgrund des heterogenen Wachstumsmusters wird der aus einem Gewebeschnitt ermittelte häufigste und schlechteste Gleason-Grad addiert (Prostatakarzinom - Diagnostik und Staging, 2007, Epstein et al., 2016).

Wird durch eine Biopsie die Diagnose Prostatakarzinom gestellt, können je nach Tumorkategorie und Risiko weitere Untersuchungen zur Ausbreitungsdiagnostik nötig sein. Dazu gehören eine Abdomensonographie, eine Computertomographie (CT) oder eine Magnetresonanztomographie (MRT) des kleinen Beckens, sowie bei hohem PSA-Wert eine Skelettszintigraphie bei Verdacht auf ossäre Metastasierung (Haring, Andrea, 2021).

2.1.2 Therapie

Je nach Stadium der Erkrankung gibt es verschiedene Therapieoptionen, wobei weitere Aspekte wie Komorbiditäten, Lebenserwartung und Patientenwünsche zu berücksichtigen sind.

Überschreitet das Tumorwachstum die Kapsel der Prostata ohne zusätzliches Vorliegen von Metastasen, spricht man von einem lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom. Befindet sich der Patient in guter körperlicher Verfassung, ist eine kurative Therapie mittels radikaler Prostatektomie, perkutaner Bestrahlung oder HDR Brachytherapie in Verbindung mit einer Hormonentzugstherapie indiziert. Bei eingeschränkter körperlicher Verfassung kann bei lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom ohne Metastasen auch die palliative Strategie des Watchful Waiting angewendet werden. Ziel hierbei ist es, die Belastung für den Patienten möglichst gering zu halten und seine Beschwerden zu lindern, ohne dabei den Tumor direkt zu behandeln (Ernst-Günther Carl et al., 2018).

Bei lokal fortgeschrittener Erkrankung oder Metastasierung ist keine kurative Therapie mehr möglich. Ziel der Therapieansätze ist es dann, das Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern und die Beschwerden des Patienten zu lindern. Bei Patienten mit hormonabhängigem Tumorwachstum besteht die Möglichkeit der medikamentösen Hormonentzugstherapie mit GnRH-Antagonisten oder einer chirurgischen Hormonentzugstherapie durch Orchiektomie (Weckermann und Harzmann, 2004). Zudem ist die Gabe von Antiandrogenen, welche den Androgenrezeptor in den Tumorzellen blockieren, möglich (Ernst-Günther Carl et al., 2018).

Bei weiterem Fortschreiten der Erkrankung stellt sich ein von der Höhe des Testosteronspiegels unabhängiges Tumorwachstum ein. Es entsteht ein sogenanntes kastrationsresistentes

Prostatakarzinom. Zu seinen Therapieoptionen zählen eine Behandlung mit Abirateron oder Enzalutamid, und Chemotherapie mit Docetaxel oder Cabazitaxel. Seit 2018 empfiehlt die Leitlinie Prostatakarzinom, dass Patienten mit kastrationsresistentem, progredientem Prostatakarzinom in gutem Allgemeinzustand, nach Ausschöpfen aller leitlinienkonformen Therapieoptionen, zusätzlich ein Therapieversuch mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA angeboten werden kann (Haring, Andrea, 2021). Im Falle eines Rezidivs besteht die Möglichkeit einer Kombinationstherapie aus Androgendeprivation und Chemotherapie.

2.2 Prostatakarzinomzelllinien

Die humane Prostata besteht aus drei verschiedenen Zellarten. Die Mehrheit davon sind Epithelzellen, welche die Drüsen bilden. Diese als Luminaltyp bezeichneten Zellen produzieren unter anderem PSA (Li et al., 2013). Ein weitaus kleinerer Teil wird als Basalzellen oder Stammzellen bezeichnet. Mit circa 1% aller Zellen bilden die neuroendokrinen Zellen den kleinsten Anteil in der Prostata. Aufgrund der unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren der verschiedenen Zellarten und deren Konsequenz für die Therapie des Prostatakarzinoms ist die Unterscheidung zwischen diesen von zentraler Bedeutung (Tai et al., 2011).

2.2.1 LNCaP-Zelllinie

Die Zelllinie LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) ist eine adhärent wachsende Prostatakarzinomzelllinie. Die Zellen stammen aus der Feinnadelpunktion eines Lymphknotens eines 50 Jahre alten Mannes mit metastasiertem Adenokarzinom der Prostata (Gaupel et al., 2013, van Steenbrugge et al., 1989). Histologisch betrachtet handelt es sich um Epithelzellen des Luminaltyps, welche die Mehrheit des Prostataparenchyms ausmachen. Somit ist naheliegend, dass sie Ausgang für die meisten Prostatakarzinome sind (Tai et al., 2011). Das Wachstum der Zellen ist androgenabhängig. Sie exprimieren außerdem das prostataspezifische Antigen (PSA) und die Prostatic Acid Phosphatase (PAP). Sie besitzen einen aneuploiden Chromosomensatz bestehend aus 76-91 Chromosomen mit 6 % polyploiden Zellen (Horoszewicz et al., 1983, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details, 4. Dezember 2020a). LNCaP-Zellen weisen einen Wild-Typ des p53-Gens auf beiden Allelen auf (Chappell et al., 2012). Die Einleitung eines Zellzyklusarrests bei Detektion von DNA-Schäden ist somit grundsätzlich möglich. Es befinden sich circa 600 000 bis 800 000

PSMA-Bindungsstellen pro Zelle an der Oberflächen von LNCaP-Zellen (Peter M. Smith-Jones et al., 2000).

2.2.2 PC3-Zelllinie

Die Zelllinie PC3 ist eine aus einer Knochenmetastase eines 62 Jahre alten Mannes mit Prostatakarzinom gewonnene adhärent wachsende Zelllinie (Kaighn et al., 1979). Histologisch betrachtet handelt es sich um neuroendokrine Zellen, welche sowohl physiologisch vereinzelt in der gesunden Prostata, als auch in geringen Mengen in Adenokarzinomen der Prostata vorkommen. Diese Karzinome werden daher auch als small cell (neuroendocrine) carcinoma (SCNC) bezeichnet. Sie betreffen nur einen geringen Teil der Patienten mit Prostatakarzinom - vor allem aber Patienten mit weit fortgeschrittenem kastrationsresistentem Prostatakarzinom nach Hormontherapie - selten auch de novo. Es wird davon ausgegangen, dass durch die Hormontherapie die Adenokarzinomzellen in Apoptose gehen, wodurch die neuroendokrinen Zellen überhand nehmen (Li et al., 2013). Klinisch zeigt sich eine aggressive Form des Prostatakarzinoms, die oft binnen Monaten tödlich endet (Tëtü et al., 1987).

PC3-Zellen exprimieren weder den Androgen- noch den PSMA-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche und wachsen androgenunabhängig. Somit ist bei Patienten mit SCNC eine Androgendeprivationstherapie erfolglos. Bei genauerer Betrachtung zeigen PC3-Zellen typische morphologische Eigenschaften neuroendokriner Zellen wie beispielsweise ein diffuses solides Wachstum ohne Drüsenbildung, eine hohe Mitoserate sowie ein feines homogenes Kernchromatin. Der Chromosomensatz ist hypotetraploid mit 3 % polyploiden Zellen (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details, 4. Dezember 2020b). Des Weiteren exprimieren PC3-Zellen neuroendokrine Marker wie CgA (Chromogranin A) und NSE (Neuronenspezifische Enolase) (Tai et al., 2011). Sie weisen zudem eine Deletion in einem der beiden Allele des p53-Gens und eine frame-shift Mutation im zweiten Allel auf. Dies schränkt die Funktion von p53 als Regulator der Apoptose für PC3-Zellen erheblich ein (Chappell et al., 2012).

2.2.3 In-vitro-Zellwachstum

Das Wachstum adhärenter Zellen in in-vitro-Kulturen gliedert sich in vier Phasen. Die erste Phase wird Anpassungsphase genannt. Sie lässt sich weiter in Latenz- und Akzelerationsphase unterteilen. In diesem Zeitraum findet die Anpassung der Zellen an die neuen Milieubedingungen statt. Auf die Anpassungsphase folgt die logarithmische Wachstumsphase mit anschließender stationärer Phase, in welcher das Wachstum der Zellen durch beginnenden Nährstoffmangel und Akkumulation toxischer Stoffwechselprodukte stagniert. Die letzte Phase wird als Absterbephase bezeichnet. Hier überwiegt der Anteil an absterbenden Zellen aufgrund der Nährstofflimitierung und Vergiftung durch toxische Stoffwechselprodukte (Rolle und Mayr, 2007).

2.3 Prostataspezifisches Membranantigen

Die Erstbeschreibung des Prostataspezifischen Membranantigens durch Horoszewicz et al. gelang 1987 durch die Entwicklung des Antikörpers 7E11.C5, welcher spezifisch an PSMA der Epithelzellen der Prostata bindet (Troyer, Beckett und Wright, JR, 1997).

PSMA ist ein Membranprotein, welches sowohl androgenabhängig in den Epithelzellen der Prostata als auch in geringerem Maße in Gehirn, Niere und Dünndarm exprimiert wird. Hierbei handelt es sich um dasselbe Protein, welches je nach Ort der Entdeckung und seiner vermuteten Funktion mit einem anderen Namen versehen wurde. Im Gehirn wird PSMA als NAALADase I (N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamatpeptidase I) bezeichnet, da es am Stoffwechsel des Neurotransmitters N-Acetylaspartylglutamat beteiligt ist. Im Dünndarm übernimmt PSMA die Aufgabe einer Folat-Hydrolase und wird daher als FOLH1 (Folathydrolase I) bezeichnet. Zudem zeigen Fallstudien eine PSMA-Expression im Tumorgewebe eines papillären Schilddrüsenkarzinoms (Taywade, Damle und Bal, 2016). Die Funktion des PSMA in der Prostata ist bis heute ungeklärt (Ghosh und Heston, 2004).

PSMA ist ein membrangebundenes Glykoprotein Typ II mit einer molaren Masse von 100 kDa. Es besteht aus einem intrazellulären Segment, einer Transmembrandomäne und einer großen extrazellulären Domäne mit COOH-Terminus. Das für PSMA kodierende Gen befindet sich auf dem Chromosom 11 mit dem Genlocus p11.12 (Rajasekaran, 2005).

PSMA wird durch Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert. Dies kann sowohl spontan (konstitutiv) ablaufen als auch durch Bindung von monoklonalen Antikörpern wie J591 initiiert werden. Das Membranprotein PSMA ist in Bereichen der Zellmembran lokalisiert, welche auf

der cytoplasmatischen Seite mit einem Clathrin-Mantel versehen sind, auch Clathrin-coated pit genannt. Nach Bindung eines Liganden stülpt sich dieser Membranbereich zu einem Clathrin-coated Vesicel ein, welches anschließend entweder über das Recycling-Endosom zurück an die Zellmembran transportiert wird oder über das Endosom zum Lysosom gelangt (Abbildung 1). Da die Mehrheit der Radioliganden nicht in der Lage ist, das Lysosom zu verlassen, werden diese mit dem Lysosom externalisiert (Bavelaar et al., 2018). Der Zielort des PSMA wird über den zytoplasmatischen Anteil des PSMA-Proteins bestimmt (Ghosh und Heston, 2004). Die Clathrin-vermittelte Endozytose wird bei der Diagnostik und Therapie mit Radioliganden wie $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ oder $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ genutzt, um Radionuklide in das Innere von Tumorzellen zu transportieren. Da PSMA in schlecht differenzierten, metastasierten und hormonrefraktären Prostatakarzinomzellen überexprimiert ist, eignet es sich somit für diagnostische und therapeutische Zwecke.

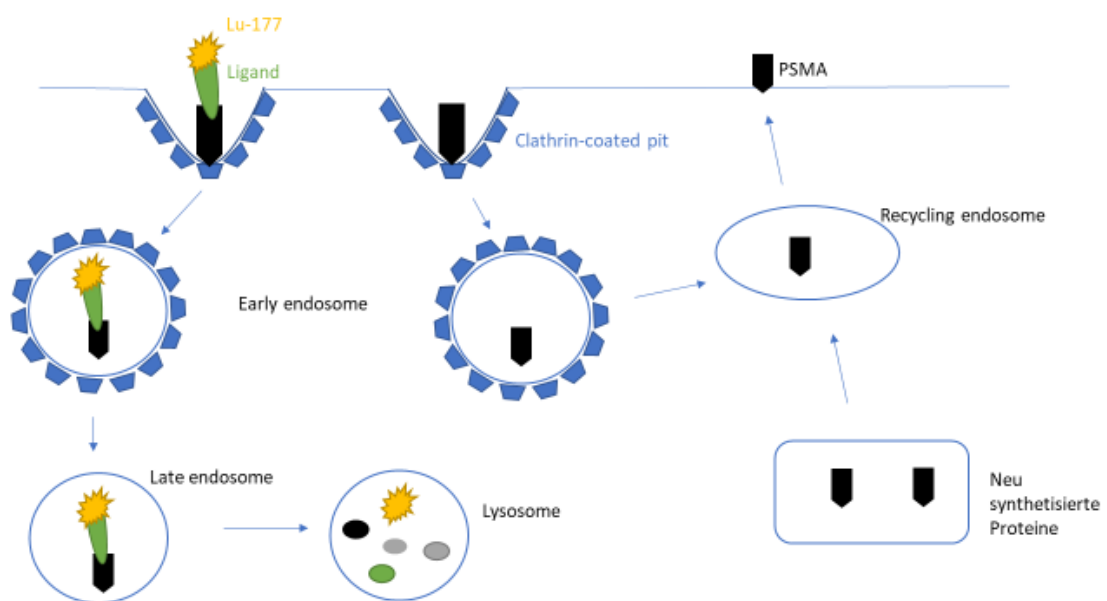


Abbildung 1 Vereinfachte Darstellung der Internalisierung von $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ in Anlehnung an (Ghosh und Heston, 2004)

2.4 PSMA-Liganden

Peptidbasierte Radiopharmaka bestehen häufig aus vier Domänen (Abbildung 2). Zu ihnen gehören das Radionuklid sowie sein Chelator, welche über einen Vermittler (Linker) mit einem Peptid, welches die Bindung an die Zielzelle ermöglicht (proteolytische Domäne), verbunden sind. Die bei der Behandlung des Prostatakarzinoms am häufigsten eingesetzten Nuklide sind im diagnostischen Bereich die Positronenemitter ^{68}Ga Gallium und ^{18}F Fluor sowie im therapeutischen Bereich die β -emitter ^{77}Lu Lutetium und ^{90}Y Yttrium. Zu den am weitesten verbreiteten Chelatoren zählen HBED-CC und DOTA (Kratochwil et al., 2016b). Die proteolytische Domäne wird durch eine Lys-uriedo-Glu-Gruppe gebildet (Kozikowski et al., 2001, Nanabala et al., 2016). Durch Kombination der einzelnen Bestandteile miteinander entstehen die unterschiedlichen Radiopharmaka wie ^{177}Lu Lu-PSMA-617, ^{68}Ga Ga-PSMA-11 etc.

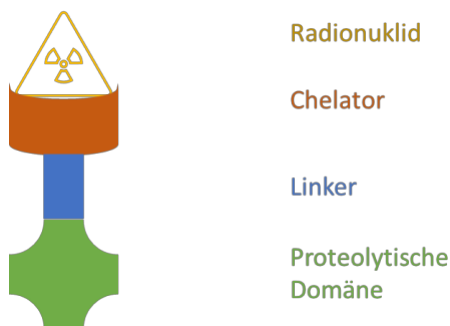


Abbildung 2 Aufbau eines Radiopharmakons

2.5 Endozytose

Endozytose bezeichnet den Prozess der Aufnahme von zellfremdem Material in eine Zelle durch Einstülpung der Zellmembran mit konsekutiver Bildung von Vesikeln. Hierfür werden zahlreiche Mechanismen unterschieden. Allen gemeinsam ist die Hemmung des Mechanismus bei Temperaturen unter 4-12 °C (Françoise Illien et al.). Der häufigste Mechanismus ist die clathrin-vermittelte Endozytose (Abschnitt 2.3), welche nach circa 10 min abgeschlossen ist (Oh et al., 2012). Endozytose kann auch in Abhängigkeit des Strukturproteins Caveolin stattfinden. Die caveolae-vermittelte Endozytose ist eine weitere Form der Endozytose, welche clathrin-unabhängig jedoch dynamin-abhängig verläuft. Sie verläuft im Gegensatz zur clathrin-vermittelten Endozytose nur nach vorheriger Stimulation ab. Als Caveolae werden flaschenförmige Einstülpungen der Membran bezeichnet, welche das Protein Caveolin

enthalten (Parton, Tillu und Collins, 2018). Diese bilden Vesikel und ermöglichen so die Endozytose. Die entstandenen Vesikel erreichen im Gegensatz zu den durch die übrigen Mechanismen entstandenen Vesikeln das späte Endosom und Lysosom nicht. Je nach Inhalt des Vesikels wird dieser im Zytosol freigesetzt oder es erfolgt eine Fusion mit anderen Zellorganellen wie dem Golgiapparat oder dem Endoplasmatischem Retikulum (Mineo und Anderson, 2001).

Eine weitere Form der Endozytose ist die Phagozytose. Damit kann die Zelle durch eine actin-vermittelte Ausstülpung ihrer Membran größere Partikel wie Mikroorganismen aufnehmen. Der Begriff Makropinozytose bezeichnet die Aufnahme größerer Mengen extrazellulärer Flüssigkeit mit den darin enthaltenen Makromolekülen (Hacker, Albrecht und Maniak, 1997). Beide Endozytoseformen verlaufen clathrin- und dynamin-unabhängig (Mayor und Pagano, 2007).

2.6 Dosimetrie

2.6.1 Dosisbegriffe

Bei Dosisbegriffen wird zwischen physikalischen Größen und Begriffen aus dem Strahlenschutz unterschieden. Zu den physikalischen Messgrößen gehört die Energiedosis.

Energiedosis (D): Die Energiedosis beschreibt die Energiemenge ($d\bar{\epsilon}$), die durch ionisierende Strahlung auf ein durchstrahltes Gewebe mit der Masse (dm) an einem bestimmten Ort übertragen wird. Die Einheit der Energiedosis ist das Gray, wobei ein Gray einem Joule pro Kilogramm entspricht (Grunert, 2019).

$$D = \frac{d\bar{\epsilon}}{dm} \quad (2.1)$$

2.6.2 MIRD-Formalismus

Der MIRD-Formalismus wurde 1976 von der Arbeitsgruppe „Medical Internal Radiation Dose“ (MIRD) der nuklearmedizinischen Gesellschaft der USA (SNMMI) entwickelt, um eine Abschätzung der absorbierten Energiedosis in Patienten zu ermöglichen. Darin werden sowohl biologische Komponenten wie die Organmassen und -formen, ihre Lagebeziehungen zueinander sowie die Biodistribution, als auch physikalische Komponenten wie die applizierte Aktivität und die räumliche und zeitlich Verteilung der Deposition der beim Zerfall abgegebenen Energie, berücksichtigt (Schlegel, Karger und Jäkel, 2018, David A. Weber,

1991). Im MIRD-Formalismus wird die konkrete Energieübertragung aus einer streng definierten Quellregion (source) auf eine ebenso streng definierte Zielregion für eine konkrete Teilchenart mit einer festgelegten Energie bewertet und tabelliert. Für Standardsituationen liegen in der Regel tabellierte Dosiskoeffizienten vor. Diese können makroskopischer (Ganzkörper und Organe/Gewebe) wie auch mikroskopischer (zellulär und subzellulär) Natur sein.

Folgende Formel bildet die Grundlage zur Berechnung der mittleren Energiedosis am Zielort:

$$\bar{D} = \frac{\tilde{A} \times \Delta \times \varphi}{m} = \tilde{A} \times S \quad (2.2)$$

Diese gilt unter der Annahme, dass eine homogene Verteilung der Radioaktivität in der Quellregion vorliegt und auch die Zielregion ein homogenes Gebilde darstellt. Dabei beschreibt \bar{D} die mittlere Energiedosis in Gray, \tilde{A} die Gesamtzahl der Zerfälle in dem Beobachtungszeitraum in Bq*sec (kumulierte Aktivität), Δ die mittlere emittierte Energie pro Zerfall, φ den Anteil der in der Quellregion emittierten Energie, welcher in der Zielregion absorbiert wurde, und m die Masse des Zielvolumens (Schlegel, Karger und Jäkel, 2018).

Die Einheit des S -Werts ist in der Regel Gy/Bq*s (Tajik-Mansoury, 2016). Der S -Wert, gibt die mittlere absorbierte Energiedosis eines Zielorts je in einem Quellort stattfindenden radioaktiven Zerfalls an. Dabei wird in seiner Syntax die Zielregion links und der Quellort rechts angegeben: $S(\text{Ziel} \leftarrow \text{Quelle})$. Er vereinigt alle oben aufgeführten Parameter eines Setups und besitzt auch nur für dieses Gültigkeit. Der S -Wert kann für alle Paare aus Quell- und Zielorten für verschiedene physikalische Prozesse numerisch berechnet werden (Nuklearmedizin, 2008). Seine analytische Berechnung hingegen ist nur in ausgewählten Szenarien möglich. Daher werden heutzutage für alle komplexen Prozesse Monte-Carlo-Simulationen herangezogen.

Um die Anzahl der Zerfälle in einer Quellregion und einem bestimmten Zeitintervall $[t_1, t_2]$ zu bestimmen (kumulierte Aktivität), wird die Zeit-Aktivitäts-Kurve integriert:

$$\tilde{A} = \int_{t_1}^{t_2} A(t) dt \quad (2.3)$$

Bezieht man die Gesamtzahl der Zerfälle \tilde{A} auf die eingesetzte Aktivität A_0 , so ändert sich die Formel für die mittlere Energiedosis \bar{D} wie folgt:

$$\bar{D} = A_0 \times \tau \times S \quad (2.4)$$

$$\tau = \frac{\bar{A}}{A_0} \quad (2.5)$$

Die dafür benötigte Verweildauer τ (engl. time-integrated activity coefficient), mit welcher die kumulierte Anzahl der Zerfälle bezogen auf die applizierte Aktivität in einem Quellorgan beschrieben wird, wird in der Regel in Stunden angegeben. Für mehrere Quellregionen h ergibt sich die Dosis \bar{D}_k in einer Zielregion k aus den summarischen Beiträgen der Teilregionen:

$$\bar{D}_k = A_0 \sum_h \tau_h \times S_{h \rightarrow k} \quad (2.6)$$

2.6.3 Effektive Halbwertszeit

Die effektive Halbwertszeit ist von der biologischen Halbwertszeit in Folge des organismusspezifischen Metabolismus und der physikalischen Halbwertszeit des Radionuklids abhängig. Sie ist ein Maß für die Zeit, die vergeht, um eine inkorporierte Aktivitätsmenge in einem vorgegeben Verteilungsraum (Organ, Blut) auf die Hälfte absinken zu lassen (Molzahn et al., 1987). Die physikalische Halbwertszeit ist charakteristisch für jedes Radionuklid. Sie definiert das Zeitintervall, in welchem noch die Hälfte der ursprünglich vorliegenden Aktivität vorhanden ist. Die effektive Halbwertszeit von [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 wurde von Abuqbeith et al. mit $0,3 \pm 0,1$ h bestimmt und liegt somit deutlich unterhalb der physikalischen Halbwertszeit von 6,647 d von [¹⁷⁷Lu]Lutetium (Abuqbeith et al., 2018). Die effektive Halbwertszeit spielt für die Therapieplanung eine wichtige Rolle (Fitschen et al., 2011).

2.6.4 Zelluläre S-Werte

Zelluläre S-Werte werden klassisch in self dose- und cross dose-Beiträge unterschieden. Während die self dose den Dosisbeitrag auf eine Zelle beschreibt, der aus einer Aktivitätsakkumulation ihrer eigenen Zellkompartimente herrührt, ist die cross dose ein Maß für Dosisbeiträge mit einem Quellort, der außerhalb der Zelle lokalisiert ist – in der Regel durch Nachbarzellen. Des Weiteren zeigten Tamborino et al., dass die Zellgröße sowie die subzelluläre Verteilung des Radiopharmakons einen erheblichen Einfluss auf den S-Wert der self dose haben. Der Dosisbeitrag durch die self dose übersteigt den der cross dose in von den Autoren Tamborino et al. entworfenen Model deutlich. Auch ist auch die intrazelluläre Verteilung der Radiopharmaka für die Dosimetrie von großer Relevanz (Tamborino et al., 2020).

In klassischen Zellmodellen werden Zellen als sphärisch symmetrische Gebilde angenommen. Daher werden Zellaufbauten durch die Radien der Zelle selbst (R_C) und des Zellkerns (R_N) charakterisiert. Auf eine Unterscheidung der Absorption von ionisierender Strahlung zugrundeliegender Materiearten wird in biologischen Systemen auf zellulärer Ebene häufig verzichtet. Es werden wasseräquivalente Gewebe angenommen.

Während die Absorption ionisierender Strahlung von Emitttern wie [^{177}Lu]Lutetium in makroskopischen Systemen gut durch einfache geometrische Formen approximiert werden kann, gilt dies für mikroskopische Gebilde, deren Dimensionen in der Größenordnung der mittleren Reichweite eines emittierten Partikels liegen, nicht mehr. Moderne Simulationen zellulärer S -Werte versuchen daher den unterschiedlichen Zellmorphologien Rechnung zu tragen und Zellformen fernab von Kugelmodellen zu adressieren (Tamborino et al., 2020).

Die S -Werte für die cross dose unterscheiden sich erheblich, je nachdem, ob die Zielzelle als einem Cluster von Zellen zugehörig bezeichnet wird, oder ob eine homogene Verteilung der Zellen in Monolayern mit einem einheitlichen Zell-Zellabstand an der Oberfläche einer Zellkulturplatte angenommen wird. Tamborino et al. zeigten, dass eine Zunahme der Zellgröße zu einer konsekutiven Abnahme der cross dose führt. Ist die Nachbarzelle weiter als der fünffache Zelldurchmesser entfernt, ist ihr Beitrag zur cross dose nach Exposition mit [^{177}Lu]Lutetium vernachlässigbar gering (Tamborino et al., 2020). Die Lage des Zellkerns innerhalb der Zelle hat hingegen keinen Einfluss auf den S -Wert des Zytoplasmas und der Zellmembran. Die Autoren zeigten zudem, dass die in der MIRDcell Software vereinfachte Annahme einer konzentrischen Sphere als Modell der Zelle, zu einer Überschätzung des Dosisbeitrags des Zytoplasmas auf den Zellkern um 65 % im Vergleich zum Modell eines Kegelstumpfes führt (Tamborino et al., 2020).

Typische, in S -Werten berücksichtigte Zellkompartimente sind der Zellkern (N), die Zellmembran/-oberfläche (Cs), die Zelle als Ganzes (C) sowie das Zytoplasma (Cy) (Abbildung 3).

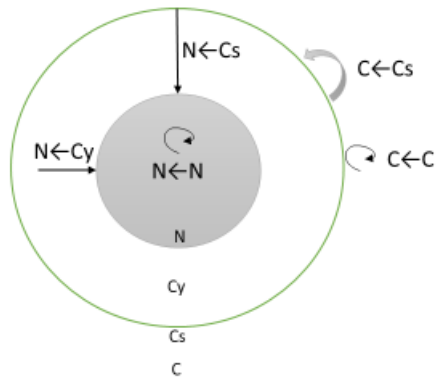


Abbildung 3: Graphische Darstellung zellulärer S-Werte N: Nukleus, C: Zelle, Cy: Zytoplasma, Cs: Zelloberfläche

2.6.5 S-Werte für ^{177}Lu Lutetium

Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen beschäftigt sich mit der Berechnung von S-Werten für zelluläre Strukturen (Abbildung 6 μ) bei ihrer Exposition mit ^{177}Lu Lutetium (Tajik-Mansoury, 2016, Chan et al., 2017, Bardiès und Chatal, 1994).

Neben den oben erwähnten Variablen existieren weitere Einflussfaktoren, die bei der Dosisberechnung innerhalb einer RLT eine Rolle spielen. Da diese allerdings so zahlreich sind, kann nicht allen gleichzeitig Rechnung getragen werden. Dazu gehören die Bildung sowie Vergrößerung bestehender Zellcluster aufgrund von Zellproliferation, die inter- und intrazellulär teils inhomogene Verteilung des Radiopharmakons, die Zellumgebung und die unterschiedliche Größe und Form der Zellen innerhalb eines Zellclusters (Tamborino et al., 2020). Aufgrund der Limitationen der durch das MIRD-Komitee zur Verfügung gestellten S-Werte haben inzwischen zahlreiche Arbeitsgruppen mit Hilfe von Monte-Carlo-Simulationen eigene S-Werte, unter Variation der verschiedenen Einflussgrößen, berechnet. Beispielsweise seien die Ergebnisse der Arbeitsgruppen um Mansoury et al., Chan et al. und Freudenberg et al. genannt. Salim et al. beschrieben zudem den Einfluss exzentrische Zellvolumina auf die S-Werte (Salim und Taherparvar, 2019).

Grundlage der Dosisberechnungen der vorliegenden Arbeit sind die von Tajik-Mansiury et al. und Tamborino et al. berechneten S-Werte (Tabelle 1). Vergleichend sind S-Werte anderer Arbeitsgruppen in den Tabelle 1 bis Tabelle 3 dargestellt. Auffällig sind die S-Werte von Chan et al. (Chan et al., 2017), welche um den Faktor 10^{-4} niedriger sind als vergleichbare Werte

anderer Gruppen. Es ist möglich, dass ein Fehler in der Dimension der angegebenen Einheit der *S*-Werte jener Forschungsgruppe vorliegt¹.

¹ Der zur Korrespondenz angegeben Autor reagierte auf eine Anfrage im Sommer 2020 nicht.

Autor	Jahr	R _C [μm]	R _N [μm]	Einheit	Self Dose						Cross Dose	
					S(C←C)	S(Cs←C)	S(N←N)	S(C←Cs)	S(N←Cs)	S(N←Cy)	S(Cs ¹ ←C')	S(C←C')
Tajik-Mansoury et al.	2015	7	3	Gy/Bq*s	3,87E-04		3,34E-03	2,05E-04	7,88E-05	2,88E-04		
Chan et al.	2017	6		mGy/MBq*s	6,70E-01			4,20 E-01				2,00E-03 ² 4,18E-04 ³
Bardies et al.	1994	10		Gy/Bq*s	2,14E-04	1,38E-04					8,56E-05	
		15		Gy/Bq*s	8,99E-05	5,82E-05					3,52E-05	

Tabelle 1: Zelluläre S-Werte für [¹⁷⁷Lu]Lutetium aus (Tajik-Mansoury, 2016, Chan et al., 2017, Bardies und Chatal, 1994) im Vergleich; ¹: R_C target: 5 μm; ²: Zell-Zell Abstand 50μm; ³: Zell-Zell Abstand 100μm

Autor	Jahr	Energie [keV]	Einheit	Self Dose				
				S(C←C)	S(C←Cs)	S(N←N)	S(N←Cy)	S(N←Cs)
Salim et al.	2019	70	Gy/Bq*sec	5,80E-04	3,92E-04	9,08E-04	4,26E-04	3,17E-04
		100		4,45E-04	3,02E-04	6,96E-04	3,25E-04	2,46E-04
		250		2,61E-04	1,76E-04	4,08E-04	1,86E-04	1,55E-04
		500		2,05E-04	1,37E-04	3,19E-04	1,48E-04	1,12E-04

Tabelle 2: Zelluläre S-Werte aus (Salim und Taherparvar, 2019)

Autor	Jahr	Modell	Volumen [μm ³]	Einheit	Self Dose		Cross Dose	
					S (N←Cy)	S(N←Cs)	S (N←Cy)	S(N←Cs)
Tamborino et al.	2020	Kegelstumpf	1,9E03	Gy/Bq*sec	1,46E-04	1,15E-04	3,56E-05	3,65E-05
			2,3E03		1,27E-04	1,03E-04	3,04E-05	3,10E-05
		Mesh Struktur	1,9E03		7,27E-05			7,66E-05

Tabelle 3: Zelluläre S-Werte Kegelstumpf aus (Tamborino et al., 2020)

2.6.6 [¹⁷⁷Lu]Lutetium

[¹⁷⁷Lu]Lutetium ist ein β-Strahler mit einer Halbwertszeit von 6,647 d (Abbildung 4). Es zerfällt unter Aussendung von Elektronen mit einer mittleren Energie von 177 keV (11,6 %), 385 keV (9,1%) und 498 keV (79,3 %) sowie Antineutrinos (Schötzig et al., 2001). Der Zerfall wird von sechs diskreten γ-Linien mit Energien von 71 bis 312 keV sowie dem Bremsstrahlungsspektrum der Elektronen begleitet.

Durch die Emission von Photonen aus den Gammaübergängen eignet sich [¹⁷⁷Lu]Lutetium nicht nur zu therapeutischen Zwecken, sondern kann auch für diagnostische bildgebende Verfahren genutzt werden. Die maximale Reichweite der β-Strahlung von < 2 mm ergibt sich aus der mittleren Energie der Elektronen (Banerjee, Pillai und Knapp, 2015).

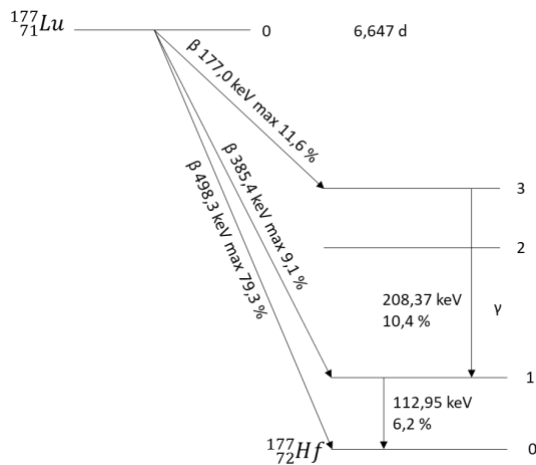


Abbildung 4: Schematische Darstellung der wichtigsten Übergänge von [¹⁷⁷Lu]Lutetium in den Grundzustand des [¹⁷⁷Hf]Hafniums in Anlehnung an (Eberlein, 2016)

2.6.7 RADAR-Formalismus

Das zur Patientendosimetrie verwendete Programm OLINDA beruht auf dem RADAR (Radiation Dose Assessment Resource) -Formalismus. Folgende Formel bildet die Grundlage zur Berechnung der Dosis:

$$D = N \times DF \quad (2.7)$$

Wobei N die Anzahl der Kernzerfälle (Number of Disintegrations) darstellt und DF den Dose Factor, welcher sich wie folgt berechnet:

$$DF = \frac{k \sum_i n_i E_i \Phi_i w_r}{m} \quad (2.8)$$

k stellt eine Proportionalitätskonstante (rad-g/ μ Ci-h-MeV oder Gy-kg/Mbq-s-MeV) dar. n_i die Anzahl an Ionisierungen und E_i die Energie pro Kernzerfall. Φ_i bezeichnet den Anteil der im Zielorgan mit der Masse m absorbierten Energie und w_r dem Gewebewichtungsfaktor.

2.7 Strahlenbiologie

2.7.1 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung auf die Zelle

2.7.1.1 Direkte und Indirekte Strahlenwirkung

Zur Differenzierung der Wechselwirkung ionisierender Strahlung unterscheidet man zwischen direkter und indirekter Strahlenwirkung. Direkte Strahlenwirkung entsteht, wenn die Energieabsorption und Ionisation in demselben Molekül stattfindet, in dem auch die Schädigung auftritt (Dertinger und Jung, 1969). Davon abzugrenzen ist die indirekte Strahlenwirkung. Sie liegt vor, wenn die Energieabsorption und Wirkung der Energie in verschiedenen Molekülen stattfinden. Indirekte Strahlenwirkung entsteht vor allem durch eine mehrstufige Reaktion von vor allem Zellwasser mit anderen Molekülen. Da Zellen größtenteils aus Wasser bestehen, sind Wassermoleküle die Hauptwechselwirkungspartner. Trifft ionisierende Strahlung auf ein Wassermolekül, dissoziiert dieses und es kommt unter anderem zur Bildung freier Radikale (Krieger, 2019). Dieser Prozess wird als Radiolyse des Wassers bezeichnet. Nach Bildung freier Radikale aus Zellwasser interagieren diese sekundär mit weiteren Molekülen wie zum Beispiel der DNA.

Beide Strahlenwirkungen können DNA-Schäden, Zellzyklusveränderungen, Zerstörung der Zellmembran oder -organellen sowie den Zelltod hervorrufen.

2.7.1.2 Ablauf des Zellzyklus und dessen Einfluss auf die Wirkung ionisierender Strahlung

Eukaryotische somatische Zellen durchlaufen einen zyklischen Ablauf von Ereignissen, auch Zellzyklus genannt (Abbildung 5). Dieser besteht aus der Mitosephase und der Interphase, welche die G1-, S- und G2-Phase beinhaltet (Schafer, 1998). Dieser sich stetig wiederholende Prozess der Zellteilung und des Zellwachstums wird als Zellproliferation bezeichnet.

Die G1-Phase wird auch als Wachstumsphase bezeichnet, da hier die nach der Zellteilung noch fehlenden Zellbestandteile wie das Zytoplasma und die Zellorganellen synthetisiert werden. Die Zelle bereitet sich zudem auf die darauffolgende Synthese-Phase (S-Phase) vor, indem die

Replikationsenzyme und die mRNA bereitgestellt werden. In der G₁-Phase ist der Chromosomensatz diploid (n=46), wobei jedes Chromosom aus einer Chromatide besteht (Schmitz und Desel, 2018). Differenzieren sich die Zellen, treten diese stattdessen in die G₀-Phase ein. In proliferierenden Zellen folgt anschließend die S-Phase. Hier wird die für die Zellteilung benötigte DNA synthetisiert. Nach Abschluss der Synthese besteht jedes Chromosom aus zwei Chromatiden. Die auf die S-Phase folgende G₂-Phase wird auch prämitotischen Phase genannt, da sich die Zelle auf die Zellteilung vorbereitet. Dazu werden die in der G₁-Phase hergestellten Enzyme und Proteine weiter modifiziert. In der sich anschließenden M-Phase (Mitose-Phase) findet die Zellteilung statt (Schmitz und Desel, 2018).

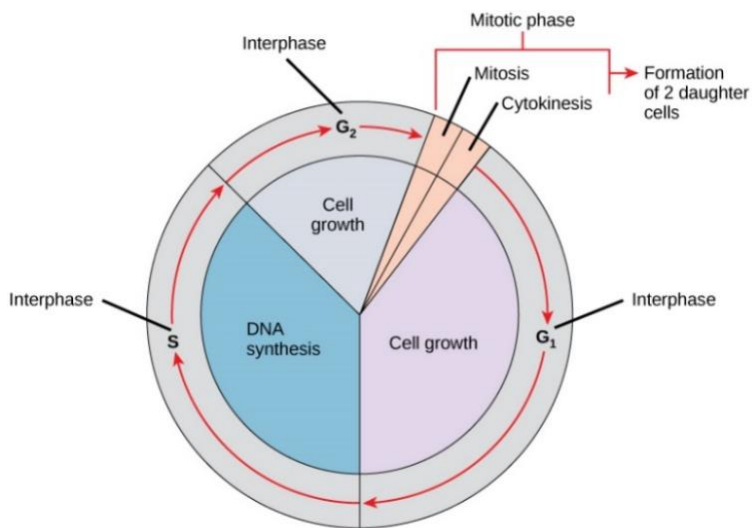


Abbildung 5 Zellzyklus aus (OpenStax, 22.8.12)

Der Zellzyklus wird an so genannten Restriktionspunkten (checkpoints), welche sich in der späten G₁- und G₂-Phase sowie in der M-Phase befinden, reguliert. Hier wird der regelrechte Ablauf der vorherigen Phasen kontrolliert und der Zellzyklus, wenn indiziert, angehalten. Dies erfolgt über je nach Zellzyklusphase unterschiedliche Cycline, die mit zellulären Proteinkinasen (CDKs engl. cycline dependent kinases) interagieren (Schmitz und Desel, 2018).

Die Strahlensensitivität einer proliferierenden Zelle ist abhängig von ihrem Zellzyklusstadium. Chromosomenaberrationen treten vor allem bei Strahleneinwirkung nach Abschluss der DNA-Synthese (G₂-M-Übergang) auf. Teilungshemmungen nach Bestrahlung sind vor allem bei Zellen in der G₂-Phase zu beobachten. Anschließend treten die Zellen nach einer

dosisabhängigen Erholungszeit (Zellzyklusarrest) wieder in den Zellzyklus ein. In der Mitose und G2-Phase sind die Zellen am empfindlichsten gegenüber ionisierender Strahlung, da die DNA in diesen Phasen am höchsten kondensiert und somit schlecht für Reparaturenzyme zugänglich ist. Der Zelltod ist in jeder Zellzyklusphase möglich. In Abhängigkeit der Zellzyklusphase wird zwischen dem Interphasetod und dem mitotischen Tod unterschieden. Der Interphasetod tritt vor allem nach hohen Bestrahlungsdosen ein, da er durch massive Störungen im Zellstoffwechsel verursacht wird. Stirbt die Zelle während oder unmittelbar nach der Zellteilung, spricht man vom mitotischen Tod. Dieser kann auch erst nach mehreren Zellteilungen auftreten, wenn die Schäden nach wiederholten Replikationen akkumulieren und in Summe letal werden. Als Ursachen werden nicht reparierte DNA-Schäden und die Zerstörung oder Veränderung von Zellorganellen vermutet (Krieger, 2019).

2.7.1.3 Zelltod nach Strahleneinwirkung

Es wird zwischen mehreren Formen des Zelltods nach Bestrahlung unterschieden. Dazu gehören die Apoptose, Nekrose, Autophagie, Seneszenz sowie die mitotische Katastrophe.

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, wird entweder durch intrinsische Signale, wie zum Beispiel irreparable DNA-Schäden, oder durch extrinsische Signalwege, wie Bindung des Tumornekrosefaktor-Rezeptors (TNF-R) an der Zelloberfläche, ausgelöst. Je nach Signalweg werden verschiedene Caspasen und Effektormoleküle aktiviert, welche den Zelltod einleiten. Die DNA der Zelle wird kondensiert und fragmentiert. Anschließend schrumpft die Zelle und schnürt apoptotische Körperchen (engl. apoptotic bodies) ab, welche die intakten Zellorganellen enthalten. Diese werden im Anschluss durch Makrophagen abgebaut. Da die Zellmembran intakt bleibt, entsteht in-vivo keine Entzündungsreaktion (Schmitz und Desel, 2018). Die Dauer der Apoptose ist abhängig von der Zellart. Sie kann zwischen 1-3 h (Lymphozyten) und 48-72 h (Keratinozyten) betragen (Haake und Polakowska, 1993). Die für den Signalweg der Apoptose wichtigen Schlüsselmoleküle sind die Caspasen 2, 3, 6-10 sowie die Apoptose inhibierenden oder fördernden Proteine der Bcl-2-Familie.

Im Gegensatz dazu ist die Nekrose ein passiver Vorgang, welcher durch exogene Noxen verursacht wird. Der dabei entstandene Schaden ist zu groß, um ein kontrolliertes Absterben der Zelle zu ermöglichen. Da die geschädigte Zellmembran permeabel ist, nimmt das Zellvolumen zu. Es kommt zur Auflockerung des Chromatins und zur zufälligen DNA-Fragmentierung (Karyolyse). Die Zelle platzt schließlich, wodurch der

nichtmembranumschlossene Zellinhalt freigesetzt wird. Die freien Zelltrümmer lösen eine Entzündungsreaktion aus und werden von Granulozyten und Makrophagen abgebaut (Schmitz und Desel, 2018). Columbano et al. postulieren das Einsetzen von Nekrose erst nach 24 h (Ledda-Columbano et al., 1991).

Autophagie ist ein zellulärer Degradationsweg zur Entsorgung oder zum Recyceln geschädigter Proteine und Zellorganellen. Die Induktion dieses Mechanismus kann in verschiedenen Situationen erfolgen. Am besten untersucht ist die Autophagie bei Hungerzuständen der Zelle. Sie kann aber auch nach Bestrahlung beobachtet werden. Ob dies ein Mechanismus des Zellüberlebens oder Zelltodes nach Bestrahlung darstellt, ist noch nicht abschließend geklärt (van der Kogel und Joiner, 2009).

Zelluläre Seneszenz bezeichnet das Phänomen, dass Zellen nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen ihre Fähigkeit zur Zellteilung verlieren. Eine vorzeitige Seneszenz kann beispielsweise nach Bestrahlung beobachtet werden. Die Zellen befinden sich in einem dauerhaften Zellzyklusarrest und sind weiterhin metabolisch aktiv. Morphologisch kennzeichnend sind ein abgeflachtes Zytoplasma und eine zunehmende Granularität (van der Kogel und Joiner, 2009).

Die mitotische Katastrophe wird bei Fehlern im Ablauf der Mitosephase eingeleitet. Sie verhindert die Entstehung von Zellklonen mit chromosomalen Aberrationen, verursacht durch Akkumulation nicht reparierter DNA-Schäden. Dies ist die häufigste Form des Zelltodes nach Bestrahlung. Es entstehen mehrkernige Riesenzellen mit nicht kondensierten Chromosomen. Des Weiteren induziert die mitotische Katastrophe die oben genannten Formen des Zelltodes unabhängig von der ursprünglich zum Tode führenden Ursache (Maria Castedo et al., 2004).

2.7.2 Wirkung ionisierender Strahlung auf den Organismus

Durch ionisierende Strahlung entstandene Strahlenschäden werden in stochastische und deterministische Schäden eingeteilt.

Stochastische Schäden sind Veränderungen in der DNA, die mit einer bestimmten Eintrittswahrscheinlichkeit auftreten. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens stochastischer Schäden nimmt mit steigender Strahlendosis zu. Der Schweregrad der Dosiswirkung ist hingegen von der Energiedosis unabhängig. Aus diesem Grund gibt es keinen Dosiswellenwert. Stochastische Schäden treten meist erst nach einer gewissen Latenzzeit auf. Ein Beispiel dafür sind Krebserkrankungen (Krieger, 2019).

Im Gegensatz zu stochastischen Schäden treten deterministische Schäden ab Überschreiten einer Schwellendosis auf. Ursächlich ist eine hohe Anzahl an apoptotischen oder nekrotischen Zellen im bestrahlten Gewebe, die zu Funktionseinschränkungen führte. Der Schweregrad des Strahlenschadens ist eine Funktion der Dosis. Mit zunehmender Dosis treten die Schäden früher auf und die Schwere des Schadens nimmt zu. Oft existiert eine Dosischwelle, unterhalb derer keine klinischen Symptome auftreten. Bei hohen Dosen treten deterministische Strahlenschäden in Form von Haarausfall und erythematöse Hautveränderungen innerhalb von wenigen Tagen oder Wochen auf (BfS - Wie wirkt Strahlung?, 26. Februar 2020). Das Hervorrufen von deterministischen Schäden in Neoplasien ist Ziel strahlentherapeutischer und nuklearmedizinischer Therapieansätze (Krieger, 2019).

2.8 Therapieschema der [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-Therapie

Eine Therapie mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA ist bis dato nur im Rahmen der Ausübung der ärztlichen Heilkunde nach §13.2b AMG möglich, da es noch kein zugelassenes Radiopharmakon gibt. Sie kann Patienten mit einem progredienten kastrationsresistenten Prostatakarzinom mit PSMA-positiver Metastasierung nach Ausschöpfung von mindestens zwei alternativen Therapiemöglichkeiten angeboten werden (Haring, Andrea, 2021). Zu den von der deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin empfohlenen Einschlusskriterien gehören ein histologisch nachgewiesenes Prostatakarzinom mit nicht resektabler Metastasierung, ein Tumorprogress unter leitliniengerechter Therapie, der Nachweis einer PSMA-Expression des überwiegenden Anteils der Tumormanifestationen, eine ausreichende Knochenmarksreserve mit einer Leukozytenzahl von >3.000/ μ l sowie einer Thrombozytenzahl von >75.000/ μ l, eine allenfalls gering eingeschränkte Nieren- und Leberfunktion sowie mindestens 6 Wochen Abstand zur letzten myelosuppressiven Vortherapie. Zur Abklärung der Indikationsstellung erfolgt obligat eine Laborbestimmung sowie eine PSMA-Bildgebung, bevorzugt ein PSMA-PET/CT-Scan (Fendler et al., 2016). Ergänzend werden eine MAG3-Nierenzintigraphie sowie eine Speicheldrüsenzintigraphie empfohlen. Die Suche nach einem standardisierten Therapieschema ist aktuell Gegenstand zahlreicher Studien (Sazan Rasul et al., 2020). Die Therapieregime einzelner Studien variieren zwischen einer einmaligen Applikation und multiplen Zyklen in einem Abstand von 8-12 Wochen mit einer Aktivität von 1,1 bis zu 9,3 GBq pro Zyklus (Sazan Rasul et al., 2020).

Die Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin empfiehlt zunächst zwei Therapiezyklen [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA. Circa 4-7 Wochen nach dem zweiten Zyklus wird eine Bildgebung zur

Reevaluation der Therapieindikation empfohlen und ggf. die Gabe eines vierten Zyklus im Anschluss. Die Standardaktivität pro Zyklus beträgt 6,0 GBq mit einer kumulativen Maximalaktivität von bis zu 18 GBq. Bei onkologischem Remissionsdruck kann die Maximalaktivität auf bis zu 37 GBq gesteigert werden (Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin, 2016).

Bei einer Therapie mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA sind sowohl akute als auch langfristige Nebenwirkungen zu berücksichtigen. Zu den akuten Nebenwirkungen zählen Schmerzen bei der Injektion, Übelkeit, Erbrechen und reversible Blutbildveränderungen - vor allem eine Thrombopenie. Die Patienten sind ebenso über die langfristigen Nebenwirkungen wie Nierenschädigung, toxische Schädigung der blutbildenden Zellen im Knochenmark, Gewichtsabnahme, Abgeschlagenheit, Speicheldrüsenschädigung mit daraus resultierendem erhöhtem Kariesrisiko, Tränendrüsenbeschädigung, Keimzellveränderungen und mögliche Induktion von Zweittumoren aufzuklären. Da sowohl Zellen des proximalen Nierentubulus als auch Zellen der Speicheldrüsen physiologisch PSMA exprimieren, kommt es zu einer Speicherung des [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA im Speicheldrüsen- und Nierengewebe mit konsekutiver Toxizität variabler Ausprägung (Baccala et al., 2007, Ahmadzadehfar et al., 2016). Aus dieser Beobachtung heraus werden die Nieren und Speicheldrüsen als die für die Therapie dosislimitierende Risikoorgane bezeichnet.

Um die maximale Effektivität einer Therapie mit Radionukliden bei gleichzeitig tolerabler Nebenwirkungsrate zu ermöglichen, ist die Dosimetrie, also die Bestimmung der Dosisverteilung im Normal- und im Zielgewebe, von zentraler Bedeutung. Die bis dato in der Nuklearmedizin verwendeten Strahlentoleranzdosen der einzelnen Organe stammen in der Regel aus der Strahlentherapie und sind aufgrund der unterschiedlichen Strahlenart, Dosisleistung und Heterogenität der Dosisverteilung nur bedingt für die Therapie mit Radionukliden geeignet (Emmett et al., 2017). Daher ist die patientenspezifische Dosimetrie zur Überwachung der Dosis im Tumor und in den Risikoorganen entscheidend, um eine sichere Therapie zu ermöglichen und gleichzeitig die maximal tolerable Aktivitätsgrenze mit dem Ziel der größtmöglichen Strahlenwirkung im Zielgewebe applizieren zu können, also das Therapeutische Fenster voll auszunutzen. Da sich die zur Dosimetrie verwendeten Protokolle je nach Klinik unterscheiden, ist ein Vergleich der erhobenen Daten zur Etablierung therapie-spezifischer Dosis-Wirkungsbeziehungen erschwert (A. Gosewisch et al., 2018).

Kabasakal et al. postulierten anhand von Biodistributionsstudien mit [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11, dass bis zu 65 GBq [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 verabreicht werden können, ohne die

Strahlentoleranzdosis des Knochenmarks von 2 Gy zu erreichen. Wird die Niere als dosislimitierendes Organ (Strahlentoleranzdosis von 23 Gy) betrachtet, wird von den Autoren eine Gesamtaktivität von 30 GBq [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 als sicher angegeben (Levent Kabasakal et al., 2015). Jedoch ist dabei zu beachten, dass die Toleranzdosen auf den Gegebenheiten der perkutanen Strahlentherapie beruhen, die in der Regel durch vergleichsweise kürzere Perioden der Normalgewebserholung charakterisiert ist.

Mit Hilfe von Blutproben bestimmten die Autoren der Studie die effektive Halbwertszeit des [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617. Diese wurde mit $17,5 \pm 11,7$ min in der Distributionsphase und $10,2 \pm 5,3$ h in der Eliminationsphase angegeben (Kabasakal et al., 2017). Die Zeit-Aktivitätskurve zeigte einen steilen Abfall der im Blut gemessenen Aktivität innerhalb der ersten 20 h mit anschließender asymptotischer Annäherung an die Zeit-Achse.

3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist, zu untersuchen in wie weit Dosis-Wirkungsbeziehungen für LNCaP- und PC3-Zellen in in-vitro-Versuchen darstellbar sind und in wie weit diese Erkenntnisse auf Patientenstudien übertragbar sind. Da PC3-Zellen keine PSMA-Bindungsstellen besitzen dienen sie dieser Arbeit als Kontrollgruppe, um spezifische Effekte bedingt durch die Aktivitätsaufnahme über den PSMA-Rezeptor, gegenüber unspezifischen Effekten abzugrenzen. Die initiale These ist, dass die PC3-Zellen gegenüber den LNCaP-Zellen durch eine rein äußere Exposition gekennzeichnet sind und somit in-situ- gegenüber ex-situ-Bestrahlungssituationen unterschieden werden können. Ein vergleichbarer Gedanke unterliegt der experimentellen Analyse des $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X}$ -Komplex, bei welchem es sich um ungebundenes $[^{177}\text{Lu}]\text{Lutetium}$ handelt. Da Lutetium als ein Metallion der Reihe der Lanthanoide in wässriger Lösung bzw. in Gegenwart von Chloridionen sehr wahrscheinlich in einer komplexierten Form vorliegt, deren chemische Struktur ad hoc nicht postuliert werden kann, wird der Terminus $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X}$ -Komplex eingeführt.

Zu Beginn der Arbeit erfolgt die Charakterisierung der Aufnahmekinetik (Abbildung 6 δ). Zur Verdeutlichung der spezifischen Wirkung des PSMA-Liganden wird die zelluläre Aufnahmekinetik von $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA}$ mit der des $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X}$ -Komplex verglichen. Untersuchungen zur Spezifität der Bindung, beispielweise durch spezifische Blockade des PSMA-Rezeptors mit PMPA, werden nicht durchgeführt, da hierzu bereits eine Vielzahl von Publikationen existieren und dies für die Fragestellung der Arbeit nicht vordergründig relevant ist. Um bei der Berechnung der zellulären Dosis die Beiträge von auf der Zelloberfläche gebundenem und zytoplasmatisch vorliegendem $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA}$ differenziert berücksichtigen zu können, werden Untersuchungen zu den prozentualen Anteilen beider Fraktionen durchgeführt. Da überraschenderweise der $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X}$ -Komplex ebenfalls zu einem signifikanten Anteil im Zytoplasma gefunden werden konnte, wurden diese Versuche auch temperaturabhängig durchgeführt, sodass Rückschlüsse auf den Mechanismus der Internalisierung gezogen werden können.

Auf Basis dieser Ergebnisse wird die kumulierte zelluläre Aktivität (Abbildung 6 λ) sowie Dosis (Abbildung 6 ν) in Abhängigkeit der Zelllinie und des Radiopharmakons im Zellversuch berechnet. Um einen Vergleich mit Daten aus Patientenstudien zu ermöglichen, wird unter Zuhilfenahme histologischer Maßzahlen wie Zellgröße und -dichte (Abbildung 6 α , β), ein Modell einer Metastase ähnlich der Geometrie einer makroskopischen Metastase erstellt. Unter

Verwendung der Ergebnisse aus den Zellversuchen wird im Anschluss die hypothetische kumulierte Aktivität (Abbildung 6 ι) sowie Dosis (Abbildung 6 κ) für die Modellmetastase berechnet. Abschließend werden die Ergebnisse der hypothetisch kumulierten Aktivität und Dosis mit der kumulierten Aktivität sowie Dosis aus Patientenstudien (Abbildung 6 θ, ζ) verglichen und die Übertragbarkeit der zellulären Ergebnisse auf die makroskopische Situation diskutiert. Des Weiteren wird die Wirkung der Radiopharmaka auf die Zelllinien LNCaP und PC3 anhand von Analysen des Zellzyklus (Abbildung 6 ο), der Zellvitalität (Abbildung 6 π) und Zellüberlebens (Abbildung 6 ε) untersucht.

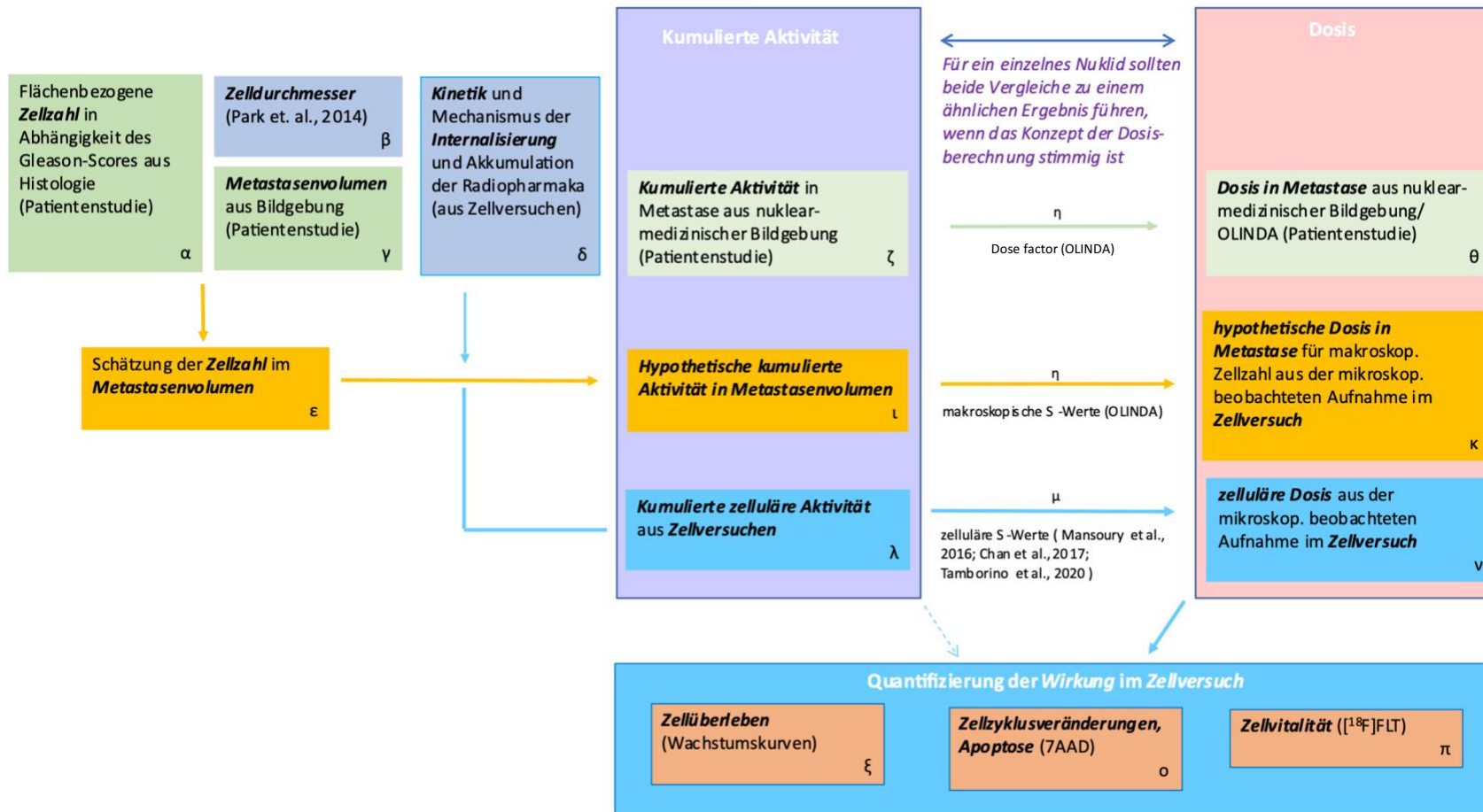


Abbildung 6: Struktur der Arbeit und Zielsetzung; Die griechischen Buchstaben dienen der Orientierung innerhalb einzelner Kapitel und Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Zelllinien

LNCaP: Lymphknotenmetastase eines Adenokarzinoms der Prostata, DSMZ, Braunschweig, Deutschland

PC3: Knochenmetastase eines Adenokarzinoms der Prostata, DSMZ, Braunschweig, Deutschland

4.1.2 Kulturmedium und Zusätze

Reagenz	Hersteller
RPMI-1640 Medium	ATCC™, Manassas, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco® Lifetechnologies™, South America
Penicillin / Streptomycin 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

Tabelle 4 Kulturmedium und Zusätze

4.1.3 Radiopharmaka

Reagenz	Hersteller
[¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617	Eigenherstellung Klinik für Nuklearmedizin, UMR
[¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA I&T	Eigenherstellung Klinik für Nuklearmedizin, UMR
[¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex	Eigenherstellung Klinik für Nuklearmedizin, UMR
[¹⁸ F]FLT	Eigenherstellung Klinik für Nuklearmedizin, UMR
Matrix	Eigenherstellung Klinik für Nuklearmedizin, UMR
Lutetium-III-Chlorid	Stem Chemicals, Newburyport, USA
Staurosporin	Labor Prof. Jaster, Abteilung für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten, UMR

Tabelle 5 Potentiell zytotoxische Substanzen und Radiopharmaka

Die in dieser Arbeit verwendeten Radiopharmaka wurden in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin Rostock unter GMP-Bedingungen (good manufacturing practice) durch die Mitarbeiter des Arbeitsbereichs Radiopharmazie hergestellt. Nach der Synthese erfolgte eine Qualitätskontrolle, welche unter anderem mit Hilfe von chromatographischen Methoden die Radiopharmaka auf ihre (radio-) chemische Reinheit und Identität prüfte.

4.1.3.1 [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617

Die Synthese von [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 erfolgte auf einem GRP-Synthesemodul der Firma Scintomics unter Verwendung des SC-05-Herstellungskits der Firma ABX, Radeberg. Zu Beginn wurde der Reaktor des Kits mit 115 µg des Precursors (PSMA-617, Artikelnummer 9934, Firma ABX) in 1 ml 0,4 M Natriumacetatlösung befüllt. Zudem wurde das n.c.a. (no-carrier-added) [¹⁷⁷Lu]Lutetium (Firma ITG) mit 0,04 M Salzsäure auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und an das Synthesemodul angeschlossen. Die modulgesteuerte Synthese von [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 erfolgte anschließend durch Erwärmung des Reaktors auf 120 °C für 10 min. Währenddessen wurden dem Reaktionsgemisch verschiedene Stabilisatoren (Tabelle 6) zugesetzt und im Anschluss mit Wasser verdünnt. Zuletzt wurde das Endprodukt modulgesteuert über einen Sterilfilter in das Endproduktgefäß überführt. Das Radiopharmakon wurde in einer Aktivitätskonzentration von 400-500 MBq/ml mit einer Aktivität von 17 µg/GBq bis 20 µg/GBq hergestellt. Die radiochemische Reinheit betrug stets ≥95 %.

Menge	Stabilisator
13 mg	Natriumascorbat
31 mg	Natriumacetat
4 mg	2,5-Dihydrobenzoinensäure
54 µg	Diethylentriaminpentaessigsäure
1 ml	0,04M Salzsäure
1 ml	0,4M Natriumacetatlösung pH 5,5
6 ml	0,04M Essigsäure
10 ml	0,9% Natriumchlorid

Tabelle 6 Stabilisatoren für die [¹⁷⁷Lu]LuPSMA-617-Synthese

4.1.3.2 [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA I&T

Die Synthese erfolgte analog zu der Herstellung von [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617. Lediglich die Peptidmenge (PSMA-I&T, Firma att) wurde derart angepasst, dass ein analoges stöchiometrisches Verhältnis vorlag, sodass im Reaktor 120 µg Peptid vorgelegt wurden.

4.1.3.3 [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex

Der [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex wurde durch Auswaschen des [¹⁷⁷Lu]Lutetium-Liefervials mit Zellkulturmedium gewonnen. Da das [¹⁷⁷Lu]Lutetium initial in 0.04 M HCl vorlag, ist anzunehmen, dass zwar geringe, aber dennoch relevante Spuren an HCl und damit an Chlorid-Ionen in der Lösung vorlagen, so dass Komplexbildungsreaktionen stattgefunden haben könnten.

4.1.3.4 Matrix

Der Begriff Matrix bezeichnet einen Hilfsstoff eines Pharmakons. Sie enthielt weder [¹⁷⁷Lu]Lutetium noch PSMA. Entsprechend erfolgte ihre Herstellung analog zu den in den Abschnitten 4.1.3.1 und 4.1.3.2 dargestellten Protokollen. Jedoch wurde anstatt eines [¹⁷⁷Lu]Lutetium-haltigen Liefervials ein gesäubertes Vial (frei von [¹⁷⁷Lu]Lutetiumresten), welches analog zum Herstellungsprozess von [¹⁷⁷Lu]-PSMA mit 1 ml 0,04 M HCl gefüllt war, an den Reaktor des Herstellungsmoduls angeschlossen. Auch wurde dem Herstellungsprozess kein Peptid zugesetzt.

4.1.3.5 [¹⁸F]FLT

Die Herstellung von [¹⁸F]FLT erfolgte auf dem Synthesemodul FASTlab2 der Firma GE Healthcare und dem Kassettensystem (Art.-Nr. 1176840, GE Healthcare). Für die Synthese wurden 20 mg 3-N-Boc-5'-O-Dimethoxytrityl-3'-O-nosyl-thymidin (Art.-Nr. 1176840, GE Healthcare) und [¹⁸F]Fluor verwendet (GE Healthcare, 2015). Das benötigte [¹⁸F]Fluor wurde am hausinternen Zyklotron (PETrace, 9,6 MeV, GE Healthcare) durch Bestrahlung von [¹⁸O]Wasser mit Protonen gewonnen und anschließend in das Herstellungsmodul überführt.

Zu Beginn der Synthese wurde das [¹⁸F]fluorhaltige [¹⁸O]Wasser über eine Anionenaustauscherkartusche in das Synthesemodul geleitet. Dies bewirkte ein Zurückhalten (*Trapping*) des [¹⁸F]Fluor auf der Kartusche, wobei das Wasser in den Abfall geleitet wird. Anschließend wurde das [¹⁸F]Fluor mit einem Gemisch aus wässrig gelöstem

Tetrabutylammoniumhydrogencarbonat (TBA-HCO₃) und Acetonitril in das Reaktionsgefäß eluiert und unter Unterdruck sowie schwachem Stickstoffstrom azeotrop getrocknet. Im Anschluss an den Trocknungsprozess wurde der in Acetonitril gelöste Precursor in das Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende nukleophile Substitution wurde bei einem Temperaturgradienten von 120 °C auf 65 °C über 15 min durchgeführt, wobei TBA als Phasentransferkatalysator diente. In den darauffolgenden 7 min erfolgte eine saure Hydrolyse bei 115 °C. Zuletzt erfolgte die Neutralisation und Aufreinigung mit erneutem Trapping und wasserbasierten Waschschrinen auf Kartuschen, sowie die finale Elution in Ethanol/Wasserlösung. Das Endprodukt wurde im Anschluss über einen Sterilfilter in das Endproduktgefäß geführt.

4.1.3.6 Wässrige Lutetium-III-Chlorid-Lösung

0,8006 g des in Pulverform vorliegenden Lutetium-III-Chlorids wurden in 10 ml destilliertem Wasser zur Stammlösung suspendiert. Die sich anschließenden Verdünnungsschritte erfolgten mit Zellkulturmedium (Tabelle 7).

Probennummer	Molarität in 1,5 ml
Stammlösung	284,6 µmol/ml
1	Kontrolle unbehandelt
2	0,0004 nmol/ml
3	0,0010 nmol/ml
4	0,0049 nmol/ml
5	0,0098 nmol/ml
6	0,0978 nmol/ml
7	0,9780 nmol/ml
8	2,4450 nmol/ml

Tabelle 7: Darstellung der Probenzusammensetzung der wässrigen Lutetium-III-Chlorid-Lösung

4.1.4 Chemikalien

Reagenz	Hersteller
Casy®clean	Roche, Mannheim, Deutschland
CASY®ton	OMNI Life Science GmbH + Co. KG, Bremen, Deutschland
Dimethyl Sulfoxide 78.13 g/mol (DMSO)	Dimethylsulfoxid AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) 1x	Gibco® by Life Technologies™, Paisley, UK
0,1 M Glycine, pH 0	Medicago AB, Uppsala, Sweden
Methanol	VWR Chemicals, Radnor, USA
PBS pH 7,4 (10X) Phosphate Buffered Saline (1:10 mit Wasser verdünnt)	Gibco® by Life Technologies™, Carlsbad, USA
Ribonuklease A 100 mg	Roth® Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blau Stain	Gibco® by Life Technologies™, New York, USA
Trypsin-EDTA	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
7-Aminoactinomycin (7-AAD)	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific, Eugene, USA

Tabelle 8 Reagenzien

4.1.5 Gebrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
CASY Probenröhrchen	OLS OMNI Life Science GmbH, Bremen, Deutschland
Cellstar® Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	GBO, Frickenhausen, Deutschland
Cryo Tubes 1,8 ml	Nunc™, Roskilde, Dänemark
Cellstar® Falcon (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Eppendorf Tubes® 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gamma-Röhrchen 3,5 ml, 55 x 12 mm	PS, Sarstadt Deutschland

Pasteurpipetten	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipetten 1-10 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl, 500-5000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 20 µl, 200 µl, 1000 µl	GBO, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 5000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
6-Well-Zellkulturplatten, wachstumsfördernd behandelt, γ-sterilisiert, pyrogenfrei, DNA/RNA-frei, DNase/RNase-frei	TPP®, Trasadingen, Schweiz
24-Well-Zellkulturplatten, wachstumsfördernd behandelt, γ-sterilisiert, pyrogenfrei, DNA /RNA-frei, DNase/RNase-frei	TPP®, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen 60,1 cm ² , 147,8 cm ²	TPP®, Trasadingen, Schweiz

Tabelle 9 Gebrauchsmaterialien

4.1.6 Geräte

Gerät	Hersteller
Aktivimeter: ISOMED 2010	NUVIA Instruments GmbH, Dülmen, Deutschland
APT.line™ CB (E3) CO ₂ -Inkubator	Binder GmbH, Tutlingen, Deutschland
Casy Model TT Zellzähler	Roche, Mannheim, Deutschland
Durchflusszytometer BD FACSCalibur	Becton Dickinson FACSCalibur, Franklin Lakes, USA
Flockeneisbereiter AF 103	Scotsman® Europe, Mailand, Italien
Heraeus Megafuge 16R Centrifuge	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA
Kühlschrank Froster 320	Kirsch, Offenburg, Deutschland
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Primo Vert Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Wasserbad VWB 26	VWR International bvba, Leuven, Belgien

Wizard ² ® Automatic Gamma-Counter	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
Zellreinbank NU-480-500E	NuAire Inc.®, Plymouth, USA

Tabelle 10 Geräte

4.1.7 Software

Name	Verwendung	Firma
BD CellQuest Pro 4.0.2	Durchflusszytometrie	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
FlowJo v10.7	Auswertung Durchflusszytometrie	Biosciences Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Microsoft Office (Excel, Word)	Text- und Datenverarbeitung	Mikrosoft, Redmond, Washington, USA
Wizard ² SW 2.1	Gamma Counter software	PerkinElmer, Waltham, USA
OLINDA 2.1.1	Dosisberechnung Patientenstudien	Vanderbilt University, Nashville, USA
Hermes Medical Solutions Version 2.8.0.0	Dosisberechnung Patientenstudien	Hermes Medical Solutions, Stockholm, Sweden

Tabelle 11 Software

4.1.8 Posttherapeutische Aufnahmeparameter der Patientenstudien

Ganzkörperaufnahmen von ap/pa	Gerät: Symbia (Siemens), IRIX (Philips) Matrix: 256x1024 Fenstereinstellung: A1: 112keV; Breite 20 %; A2: 208keV; Breite 12 % Aufnahmedauer: 20 min
SPECT	Gerät: Symbia (Siemens) Matrix: 128x128 Fenstereinstellung:

	<ul style="list-style-type: none"> – A1: 112keV; Breite 20%; – B2: 208keV; Breite 12% – C3: 208keV; Breite 15% (unt. Streustrahlung A1) – D4: 208keV; Breite 11% (unt. Streustrahlung B2) – E5: 208keV; Breite 15% (ob. Streustrahlung A1) – F6: 208keV; Breite 10% (ob. Streustrahlung B2) <p>32 Bilder a 25 Sekunden</p>
--	--

Tabelle 12 Posttherapeutische Aufnahmeparameter der Patientenstudien

4.2 Methoden

Wenn im Folgenden nicht abweichend beschrieben, wurden alle Reagenzien vor Beginn im Wärmebad bei 37 °C vorgewärmt. Die Zentrifugation erfolgte bei 37 °C für 4 min mit 400 g. Für die Zellversuche wurden je circa 200 000 Zellen je Well einer 6-Well Platte ausgesät und für 48 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden vor Beginn jedes Versuchs lichtmikroskopisch auf ihre Konfluenz, Morphologie und Kontamination hin überprüft. Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen passagiert. Um die Zellen zu ernten, wurden diese mit Trypsin für 3-5 min im Brutschrank inkubiert.

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Kryokonservierung von Tumorzellen

Um die zuvor kultivierten Zellen für zukünftige Versuche mit derselben Passage haltbar zu machen, wurden diese kryokonserviert. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte bis einschließlich der Trypsinierung wie in Absatz 4.2.1.3 beschrieben. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in einer Lösung aus 10 % DMSO und 90 % Zellkulturmedium resuspendiert und in Kryoröhrchen umgefüllt. Diese wurden zunächst in einen Gefrierbehälter gestellt, welcher mit Isopropanol gefüllt war. Dieser ermöglichte eine schonende Abkühlung der Zellen um circa 1 °K/min im Gefrierschrank auf -20 °C. Nach 24 h im Gefrierschrank wurden die Kryoröhrchen samt Gefrierbehälter in den auf -80 °C temperierten Gefrierschrank überführt und nach weiteren 24 h in den Stickstofftank zur endgültigen Lagerung bei -196 °C umgesetzt.

4.2.1.2 Auftauen und Inkulturnahme von Tumorzellen aus dem Kryostock

Hierzu wurde ein Kryostock dem Tank mit flüssigem Stickstoff entnommen und für circa 2 min unter vorsichtigem Schwenken im Wärmebad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde schnellstmöglich in ein Falcon mit vorgelegtem Zellkulturmedium überführt, um das zytotoxische DMSO zu verdünnen. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in eine Schale mit 10 ml Zellkulturmedium überführt. Nach 48 h wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf Konfluenz, Morphologie und Kontamination hin überprüft und vollständig auf die nächstgrößere Zellkulturplatte passagiert.

4.2.1.3 Passagieren von Tumorzellen

Nach Abnahme des Zellkulturmediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin geerntet. Der sich anschließenden Zentrifugation folgend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 2 bis 4 ml Zellkulturmedium resuspendiert und anschließend in gewünschter Anzahl auf die neuen Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden im Anschluss wieder im Brutschrank gelagert und nach 48 h erneut passagiert oder einem Zellkulturmediumwechsel unterzogen.

4.2.2 Zellzählung

4.2.2.1 Zählkammer nach Neubauer

Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer, dem Goldstandard zur Zellzählung, kann die Zellkonzentration einer Zellsuspension bestimmt werden. Die Zellsuspension wurde vor Beginn gründlich resuspendiert und gegebenenfalls verdünnt, um eine optimale Anzahl an Zellen pro Gesichtsfeld zu erreichen. Sollte zusätzlich eine Vitalitätsbestimmung erfolgen, wurden 10 µl der Zellsuspension 10 µl Trypanblau zugesetzt. Alle 4 Zählkammern wurden lichtmikroskopisch ausgezählt und ein Mittelwert \bar{n} gebildet. Die Zellkonzentration N (ml^{-1}) ergibt sich zu:

$$N = \bar{n} \times 2 \times 10^4 \quad (4.1)$$

4.2.2.2 CASY Zellzähler

Um die Zellzählung zu erleichtern und Versuche bei hoher Probenanzahl in kurzer zeitlicher Abfolge zu ermöglichen, wurde der CASY Zellzähler Model TT verwendet. Für jede Zelllinie wurde zu Beginn ein Protokoll angelegt, in welchem die Probenmenge und CASY®ton-Menge - hier 10 ml - festgelegt wurde. Im Anschluss wurde das Fenster zur Evaluierung lebender Zellen neben toten Zellen durch ein Protokoll mit gezielter Zelltötung ermittelt. Das dabei genutzte Protokoll entsprach dem Vorgehen des Gerätehandbuchs. Die Messungen wurden initial mit den Ergebnissen der Handzählung mittels Zählkammer nach Neubauer und Trypanblau-Färbung verglichen und für geeignet befunden.

Ein Messablauf mit dem CASY Zellzähler stellte sich wie folgt dar. Die Zellen wurden wie für die Zellzählung mittels Zählkammer nach Neubauer geerntet und aufgearbeitet. Zur Messung wurde eine definierte Menge Zellsuspension (50 µl oder 200 µl) zu einer definierten Menge an Messlösung (10 ml CASY®ton) in einen CASY®cup pipettiert und anschließend gevortext. Durch eine Kapillare wurde die Zellsuspension zur Messspore geführt und dreimal gemessen. Je nach Partikelgröße und Vitalität wurde mittels elektrischen Stroms ein entsprechendes Signal generiert, welches über Softwareverarbeitung zu einem Datensatz ausgegeben wurde (Roche Diagnostics GmbH, 2010).

4.2.3 Gamma-Counter Messungen

Mit Hilfe eines Gamma-Counters kann die von einer Probe emittierte Gammastrahlung gemessen werden. Dabei trifft die Gammastrahlung auf einen Szintillator, welcher aus einem NaI-Kristall mit 0,5 % Thallium-iodid besteht. Emittierte Photonen können mit einer Photomultiplieröhre verstärkt und anschließend hinsichtlich ihrer Energie und Intensität ausgewertet werden (Gamma Counter, 2020).

Die Proben der Aufnahmeversuche mit [¹⁷⁷Lu]Lutetium-haltigen Radiopharmaka, sowie die Proben der Vitalitätsbestimmung mit [¹⁸F]FLT wurden im Gamma-Counter gemessen. Dafür wurde die zu messende Probe in ein Counter-Röhrchen pipettiert und verschlossen. Das Probenrack wurde anschließend mit dem zum Messprotokoll passenden Barcode versehen. Vor Beginn der Messung wurden der Normierungszeitpunkt sowie die Halbwertszeitkorrektur in den Einstellungen des Protokolls ausgewählt.

Für die Umrechnung der durch den Gamma Counter gemessenen cpm in MBq wurde einmalig der sogenannte Bohrlochfaktor bestimmt. Dafür wurde eine definierte Menge [¹⁷⁷Lu]Lutetium

sowohl im Aktivimeter als auch in einer definierten Verdünnung im Gamma-Counter gemessen und der Messwert des Gamma-Counters durch den Messwert des Aktivimeters, geteilt.

Im Folgenden werden die am Gamma-counter gemessenen cpm als zelluläre Zählrate bezeichnet.

4.2.4 Durchflusszytometrie

Diese Versuche wurden in Kooperation mit dem Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie durchgeführt.

4.2.4.1 Messprinzip

Der Begriff FACS (fluorescence-activated cell sorter) bezeichnet ursprünglich Durchflusszytometer, die zusätzlich die analysierten Zellen sortieren, um sie entsprechend weiter zu verwenden. Inzwischen wird der Begriff FACS jedoch auch synonym für die analytische Durchflusszytometrie verwendet. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde die analytische FACS-Methode genutzt.

Mittels Durchflusszytometer können Merkmale der Membranoberfläche sowie indirekt auch intrazelluläre Strukturen einzelner Zellen anhand ihrer charakteristischen Lichtstreuung bestimmt werden (Gompf et al., 2016). Dafür werden die Zellen nacheinander an einem Laser vorbei geführt und die daraus resultierende Lichtstreuung an einem Detektor gemessen. Zusätzlich ist auch eine Fluoreszenzmarkierung möglich, deren Detektion wellenlängenabhängig erfolgt. Um eine genaue Messung zu ermöglichen, müssen die Zellen aus ihrem Verband gelöst und vereinzelt werden. Die einzelnen Zellen werden in einem Probenpuffer suspendiert und von Hüllflüssigkeit umgeben durch eine Quarzküvette zur Analyse geleitet. Der Laserstrahl wird elliptisch auf den Probenstrahl gebündelt und das entstandene Streulicht an einer Photodiode detektiert. Dabei werden zwei Signale unterschieden. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter = FSC) und das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter = SSC). Das Vorwärtsstreulicht wird entlang der Achse des einfallenden Lichtstrahls gemessen und gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht wird im rechten Winkel zur Achse des einfallenden Lichts detektiert. Es gibt Aufschluss über die Zusammensetzung und die Granularität intrazellulärer Kompartimente (Rothe, 2007). Mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Zellen emittieren zudem durch Anregung mittels Laserstrahls

Fluoreszenzlicht, welches über Filter geleitet an zusätzlichen Detektoren gemessen wird. Die optischen Signale werden anschließend digital verarbeitet.

Für die Probenanalyse der mit 7AAD gefärbten Zellen (Abschnitt 4.2.8) wurde der blaue Laser des FACSCalibur verwendet. Zur Einstellung der Spannung des Gerätedetektors, wurde eine ungefärbte Kontrolle (Negativkontrolle) mitgeführt. Je Probe wurden 20000 Zellen analysiert. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo. Nach einem sogenannten Gating, bei dem der Zelldebris sowie die Doubletten eliminiert wurden, erfolgte die Auswertung der Ergebnisse wie von M. G. Ormerod in „Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry“ beschrieben (Ormerod, 2002).

4.2.5 Allgemeines zum Versuchssetup aller Versuche

Alle Versuche dieser Arbeit wurden wie folgt begonnen. Initial wurden 200 000 Zellen pro Well eingesät. Entsprechend der Verdopplungszeit befanden sich nach 48 h circa 400 000 Zellen in einem Well. Jedes Well wurde mit einer Aktivitätskonzentration von 0,5 MBq/2 ml bis 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA oder [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex inkubiert. Folglich ergab sich ein initiales Aktivitäts-Zell-Verhältnis zwischen 1,3 Bq/Zelle und 7,8 Bq/Zelle. Abbildung 7 zeigt die Geometrie der verwendeten 6-Well Platten.

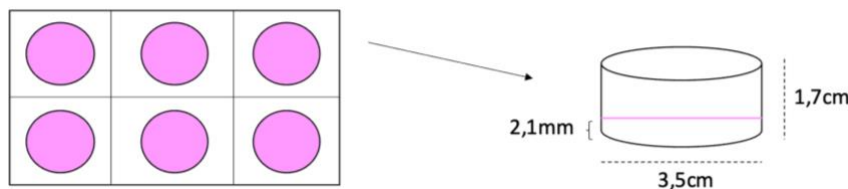


Abbildung 7: Darstellung der Geometrie einer Kavität einer 6-Well Platte mit 2 ml Zellkulturmedium gefüllt

4.2.6 Aufnahme-Versuche

Die Vorbereitung und Aussaat der Zellen erfolgte für die Aufnahmeversuche erfolgte wie in Abschnitt 4.2.5 beschrieben. Nach Herstellung der benötigten Aktivitätskonzentration (0,5 MBq/2 ml – 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 oder [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex) wurde diese zum Zeitpunkt t_0 in die Wells hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation im Brutschrank; je nach Versuchsreihe für 30 min bis maximal 24 h. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin geerntet. Hiervon wurden 200 μ l für die Zellzählung mittels CASY-Zellzähler oder Zählkammer nach Neubauer abgenommen und die

verbleibenden 1800 µl der Zellsuspension in Counter-Röhrchen zur Messung im Gamma Counter überführt. Eine Leerwertkontrolle wurde stets mitgeführt. Hierzu wurden die leeren Wells mit derselben Menge Medium sowie Aktivitätskonzentration des Radiopharmakons inkubiert und anschließend wie die Zellproben aufgearbeitet. Bei den Proben, deren Aktivitätsaufnahme 48 h nach Inkubationsbeginn gemessen wurde, wurde das aktive Zellkulturmedium nach 24 h abgenommen, die Zellen anschließend zweimal mit PBS gewaschen, frisches Zellkulturmedium zugegeben und zum Aufarbeitungszeitpunkt nach weiteren 24 h (insgesamt 48 h nach t₀) erneut mit PBS gewaschen und anschließend wie oben beschrieben geerntet. Um die Blutpool-Verfügbarkeit der Radiopharmaka zu simulieren, wurde eine Inkubationszeit von 24 h gewählt. Die Grundlage dafür bildete die von Kabasakal et al. bestimmte effektive Halbwertszeit von [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 mit 17,5 ±11,7 min in der Distributionsphase und 10,2 ±5,3 h in der Eliminationsphase (Kabasakal et al., 2017). Für die Zellüberlebensversuche wurden stets auch unbehandelte Kontrollen mitgeführt.

Es wurde ein Beobachtungszeitraum von 48 h nach Bestrahlungsbeginn gewählt, da die Verdopplungszeit der LNCaP-Zellen etwa 48 h beträgt (Abschnitt 10.4.2.1). Eine Verlängerung des Beobachtungszeitraumes war nicht möglich, da die Kontrollgruppe nach diesem Zeitraum bereits eine Konfluenz von 80 % erreicht hatte und sich somit in der stationären Phase befand. Das heißt, dass aufgrund des fehlenden Platzes im Zellkulturwell das Wachstum nicht mehr exponentiell, sondern aufgrund der Mangelsituation ab diesem Zeitpunkt eingeschränkt erfolgte.

4.2.7 Bindungsspezifität und Internalisierung

Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen in ein Falcon-Röhrchen überführt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Zellen zur Entfernung des Überstandes zentrifugiert. Darauf folgte zweimalig eine 5-minütige Inkubation mit Glycin, um die membrangebunden Fraktion zu lösen. Im Anschluss wurden die Zellen in Trypsin resuspendiert und der Zellzählung zugeführt. Alle zum Waschen und Resuspendieren verwendeten Reagenzien wurden einzeln aufgefangen und im Gamma Counter gemessen. Die Inkubation und Aufarbeitung erfolgte sowohl bei 37 °C als auch bei 4 °C, um die Bindungsspezifität der Liganden zu differenzieren.

4.2.8 Durchflusszytometrie zur Evaluation einsetzender Apoptose nach Inkubation mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617

Hierfür wurden die Proben beider Zelllinien wie in Abschnitt 4.2.6 beschrieben mit 1 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 für 48 h inkubiert. Das aktive Zellkulturmedium wurde zum Erntezeitpunkt abgenommen und zusammen mit den Zellen weiter aufgearbeitet. Grund für die gemeinsame Aufarbeitung des Überstandes und Zellpellets sind die sich möglicherweise im Überstand befindlichen apoptotischen und nekrotischen Zellen, die sich durch den Vorgang des Zelltods aus dem Verband gelöst haben könnten und in den FACS-Untersuchungen mit erfasst werden sollten.

Die Zellen wurden mittels Trypsin geerntet und anschließend je zwei Mal mit eiskaltem DPBS gewaschen. Das Pellet wurde in 400 µl DPBS und 3,6 ml Methanol (70 % in DPBS) aufgenommen und zur Fixierung über Nacht bei -20 °C gelagert. Die fixierten Zellen wurden am darauffolgenden Tag zweimal mit 5 ml eiskaltem DPBS gewaschen und die Pellets aller Proben mit jeweils 250 µl RNase (25µg/ml) für 15 min bei 37 °C im Wärmebad inkubiert. Anschließend wurden 750 µl DPBS zugegeben. Die Zellsuspension - ausgenommen einer ungelabelten Kontrollpopulation - wurde darauffolgend mit 10 µl 7AAD-Stocksolution gefärbt und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Für die Messung wurde je eine bezüglich der [¹⁷⁷Lu]Lu-Aufnahme unbehandelte Kontrolle in gleicher Weise wie die behandelten Proben aufgearbeitet.

4.2.9 Vitalitätsbestimmung mittels [¹⁸F]FLT

Die Zellen wurden für 24 h mit 1 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 oder 1 MBq/2 ml des [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Nach Zugabe neuen Zellkulturmediums wurden die Zellen für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert. Insgesamt 72h nach Beginn der Behandlung mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 oder dem [¹⁷⁷Lu]LuX-Komplex wurde mittels [¹⁸F]FLT-Aufnahme die Vitalität der Zellen bestimmt. Hierfür wurden die Zellen mit je 1 MBq/2 ml [¹⁸F]FLT/Well für 2 h inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium abgenommen, je einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin geerntet. Anschließend wurde die Zellsuspension jeweils mit dem Protokoll für [¹⁷⁷Lu]Lutetium und für [¹⁸F]FLT im Gamma-Counter gemessen. Für eine Separation des gesamten Messsignals zwischen den Beiträgen des [¹⁸F]Fluors (511 KeV) und [¹⁷⁷Lu]Lutetium (im Wesentlichen durch Photonen der Energien 133 KeV, 208 KeV sowie Bremsstrahlung bestimmt, Abschnitt

2.6.6) untersuchen zu können, wurden die Proben in unterschiedlichen Inkubationskombinationen gemessen (Tabelle 13).

Probe	Zusammensetzung
Kontrolle 1	[¹⁸ F]FLT
Kontrolle 2 a	[¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617
Kontrolle 2 b	[¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex
Probe a	[¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617+ [¹⁸ F]FLT
Probe b	[¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex + [¹⁸ F]FLT

Tabelle 13 Probenzusammensetzung zur Vitalitätsbestimmung mittels [¹⁸F]FLT

4.2.10 Dosisberechnung basierend auf zellulären Aufnahmeversuchen

Basierend auf den Ergebnissen der in-vitro-Versuche erfolgte die Berechnung der Dosis (Abbildung 6 v) über die kumulierte Aktivität (Abbildung 6 λ) und ihre Transformation mittels zellulären S-Werten in jedem Experiment. Hierzu wurde die aus den Messungen mit dem Gamma-Counter erhaltenen Aktivitätsdaten zu jedem Zeitpunkt, welche durch die Software bereits einer Zerfallskorrektur unterzogen wurden, zunächst um diese Zerfallskorrektur korrigiert, um die real zu jedem Zeitpunkt vorliegende Aktivität zu erhalten. Im Anschluss wurde die Zeit-Aktivitäts-Kurve in zwei Phasen geteilt (Abbildung 8). Die erste Phase (Phase I) umfasst die Inkubation der Zellen im aktiven Zellkulturmedium im Zeitraum von 0 bis 24 h. Die Entfernung des aktiven Zellkulturmediums markiert den Beginn der zweiten Phase (Phase II). Nach Auftragen der Messpunkte im Diagramm wurde eine polynomische Funktion 2. Grades (Aufnahme in Phase I) oder eine Exponentialfunktion (Abgabe in Phase II) an die Daten angepasst. Da die vergleichenden Dosimetriestudien am Patienten einen Beobachtungszeitraum von 72 h umfassten, wurden die experimentellen Daten der Phase II mit Hilfe der Exponentialfunktion auf 72 h extrapoliert. Anschließend erfolgte die Berechnung des Integrals der Phasen I und II. Um die intrazelluläre Verteilung des Radiopharmakons zwischen der Membran und dem Zytoplasma Rechnung zu tragen, wurde Phase I basierend auf den Ergebnissen der Versuche zur Bindungsspezifität und Internalisierung (Abschnitt 5.4) in die Abschnitte A-C unterteilt. Für den ersten Abschnitt A (0-2 h) wurde ein überwiegend an der Membran gebundenes Radiopharmakon angenommen. Im zweiten Abschnitt B (2-5 h) wurde die Verteilung des Radiopharmakons zwischen Membran und Zytoplasma zum Messpunkt 2 h der Versuche zur Bindungsspezifität und Internalisierung (Abschnitt 5.4) verwendet. Für die

Dosisberechnungen im dritten Abschnitt C (5-24 h) sowie der Phase II (Abschnitt D, E) wurde die Verteilung des Radiopharmakons zum Messzeitpunkt 24 h zugrunde gelegt (Abbildung 8, Abbildung 9).

Im nachfolgenden Schritt wurden die einzelnen Dosisbeiträge mit Hilfe der zellulären S -Werte berechnet (Abschnitt 5.6). In Anlehnung an die von Chatterjee et al. beschriebene Größe der PC3- und LNCaP-Zellen wurde dabei ein Zellradius von 7 μm sowie ein Zellkernradius von 3 μm zur Auswahl der S -Werte herangezogen. Die verwendeten S -Werte wurden der Arbeit von Mansoury et al., sowie von Tamborino et al. entnommen (Tajik-Mansoury, 2016, Tamborino et al., 2020) (Tabelle 1).

Es erfolgte die Berechnung des Dosisbeitrags entweder (1) für die Gesamtzelle oder (2) für den Zellkern. Bei der Berechnung des Beitrags für die Gesamtzelle wurden sowohl S -Werte herangezogen, die den Beitrag von einem hypothetischen homogen im Zellinneren verteilten ($C \leftarrow C$) als auch von einem auf der Zelloberfläche ($C \leftarrow C_s$) akkumulierten Radiopharmakons berücksichtigen. Ferner wurden *cross dose-Beiträge* benachbarter Zellen in einem Abstand von 50-100 μm ($C' \leftarrow C$) sowie Beiträge des Mediums im Überstand berücksichtigt. Die Abschätzung des Dosisbeitrags für den Zellkern erfolgte durch die Verwendung von S -Werten, welche ebenfalls entweder von einer homogenen Verteilung des Radiopharmakons in Zellinneren ($N \leftarrow C$) oder an der Zelloberfläche ($N \leftarrow C_s$) ausgehen.

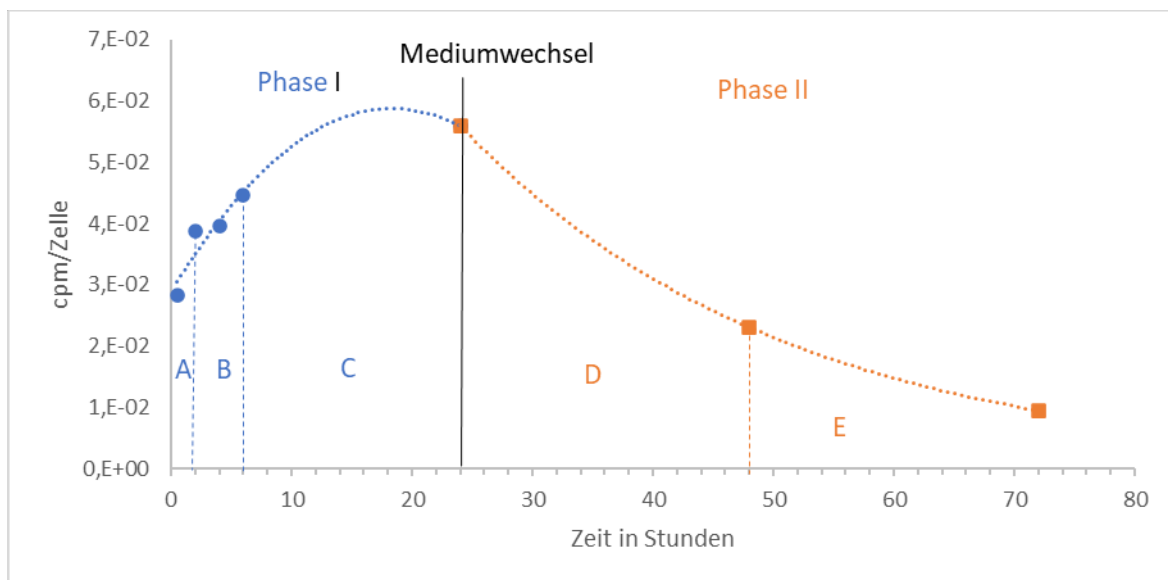


Abbildung 8: Darstellung der Aufnahmefunktion (ohne Zerfallskorrektur) für LNCaP mit den Integrationsintervallen: A (0-2 h) Bindung des Radiopharmakons überwiegend an der Membran, B (2-5h) Verteilung des Radiopharmakons zwischen Membran und Zytoplasma zum Messpunkt 2 Stunden aus den Ergebnissen der Versuche zur Bindungsspezifität und Internalisierung übernommen; C (5-24h) und D (24-48h) sowie E (48-72h) liegt die Verteilung des Radiopharmakons zwischen Membran und Zytoplasma zum Messpunkt 5 Stunden in den Versuchen zur Bindungsspezifität und Internalisierung zugrunde

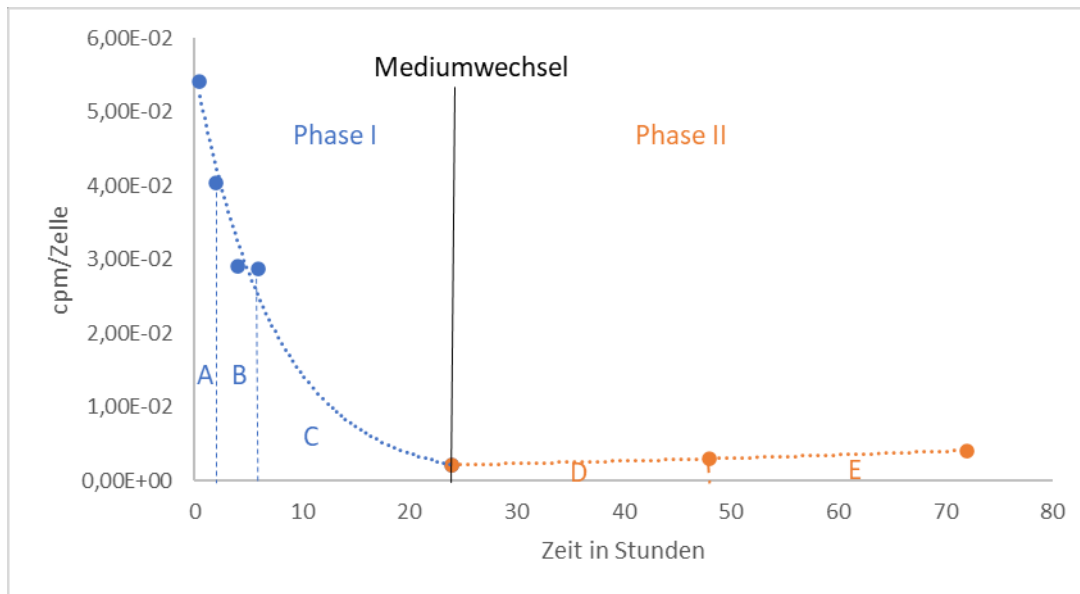


Abbildung 9 Darstellung der Aufnahmefunktion (ohne Zerfallskorrektur) für PC3 mit den Integrationsintervallen: A (0-2 h) Bindung des Radiopharmakons überwiegend an der Membran, B (2-5h) Verteilung des Radiopharmakons zwischen Membran und Zytoplasma zum Messpunkt 2 Stunden aus den Ergebnissen der Versuche zur Bindungsspezifität und Internalisierung übernommen; C (5-24h) und D (24-48h) sowie E (48-72h) liegt die Verteilung des Radiopharmakons zwischen Membran und Zytoplasma zum Messpunkt 5 Stunden in den Versuchen zur Bindungsspezifität und Internalisierung zugrunde

Ergänzend wurde der Dosisbeitrag, welcher durch das $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ -haltige Zellkulturmedium entstand, berechnet. Hierfür wurden die von Mansoury et al. berechneten S-Werte für eine fiktive Zelle mit 30 μm Zellradius und 6 μm Zellkernradius interpoliert. Es wurde ein Volumen von 2 ml pro Well angenommen.

4.2.11 Dosisberechnung für eine Metastase im Patienten

Um zu überprüfen, in wieweit die gewählten Aktivitätskonzentrationen des Mediums sowie die Inkubationsdauer zu einer mit der klinischen (makroskopischen) Situation vergleichbaren zellulären (mikroskopischen) Situation führt, wurden die in-vitro Ergebnisse mit Dosimetriestudien von zwei Patienten der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der UMR (KNUK), welche je ein Beispiel für eine Knochen- bzw. eine Weichteilmetastase repräsentierten, exemplarisch verglichen. Die hierfür verwendeten Rohdaten einzelner Therapieprotokolle wurden durch die KNUK zur Verfügung gestellt. Mit ihnen wurde beispielhaft die Dosis, welche nach einem Therapiezyklus $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ in der Metastase erreicht wurde, berechnet. Hierfür wurde eine Zeit-Aktivitäts-Kurve eines definierten Volumens (konturierte Metastase) anhand von SPECT-Daten zu vier Zeitpunkten ermittelt.

Abschließend wurde mit der Software OLINDA auf Basis des RADAR-Formalismus unter Zuhilfenahme des relativen Uptakes die Dosis je appliziertem Megabecquerel berechnet. Der relative Uptake berechnet sich als prozentualer Anteil des Uptakes der Metastase von der Gesamtmenge des applizierten Radiopharmakons.

Mit den hausinternen Therapieprotokollen wurde zunächst die Größe und das Gewicht des Patienten, die applizierte Menge des Radiopharmakons, sowie das Datum mit Uhrzeit der Applikation ermittelt. Anschließend wurden SPECT und CT-Daten fusioniert. Der initial einmalig durchgeführte CT-Scan wurde für die Schwächungskorrektur der SPECT-Aufnahmen, welche in der Regel zum Zeitpunkt 2 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Injektion stattfanden, benötigt. Anschließend wurde in jeder Schicht der fusionierten Daten eine Region of Interest (ROI) entsprechend der anreichernden Metastase gelegt und zu einem Volume of Interest (VOI) zusammengefasst (Abbildung 6 γ). Basierend auf den Intensitäten der Grauwertskala konnte für jedes VOI die Aktivität in Becquerel sowie der relative Uptake ermittelt werden. Im Anschluss erfolgte die Dosisberechnung mit OLINDA. Hierfür wurde das ICRP 89 Adult Male Modell verwendet. Aus dem berechneten relevanten Uptake zu den einzelnen Applikationszeitpunkten wurde mithilfe von OLINDA die *Number of Disintegrations* (Zerfälle im VOI über die gesamte Zeit = kumulierte Aktivität) berechnet (Abbildung 6 ζ). Unter Verwendung eines sphärischen Modells zur Modellierung der Metastasengeometrie wurde folgend die Dosis bezogen auf die applizierte Aktivität bestimmt (Abbildung 6 θ).

4.2.12 Zelldichte

Um die vergleichenden Dosisberechnungen in Abschnitt 4.2.13 durchzuführen, wurde die Zelldichte der Prostata anhand von Literaturdaten ermittelt. Die Arbeitsgruppe um Chatterjee (Chatterjee et al., 2015) analysierte mit Hilfe des digitalen Bildverarbeitungsprogramms Image Pro Premier histologische Präparate der Prostata von 14 Patienten mit Prostatakarzinom nach Prostatektomie. Insgesamt wurden 553 Schnitte angefertigt, davon 395 mit gesundem Gewebe, 95 mit Gleason-Score 3, 49 mit Gleason-Score 4 und 14 mit Gleason-Score 5. Hierdurch konnte eine durchschnittliche flächenbezogene Anzahl an Zellkernen (Abbildung 6 α), in Abhängigkeit des Gleason-Scores und unter Berücksichtigung des histologischen Aufbaus des Prostatagewebes bestimmt werden (Tabelle 14). Für die weiteren Berechnungen wird die Anzahl der Zellkerne mit der Zellzahl gleichgesetzt. Es wurde nicht zwischen Stroma- und Epithelzellen unterschieden.

Chatterjee et al. zeigten zudem, dass $40,9 \pm 1,7$ % der Fläche eines analysierten histologischen Präparats der gesunden Prostata den Stromazellen zugeordnet werden kann und $32,5 \pm 1,3$ % den Epithelzellen. Die verbleibenden $26,6 \pm 1,1$ % werden als Lumen bezeichnet. Das Verhältnis zwischen Stroma und Epithelzellen ändert sich signifikant bei maligner Transformation des Gewebes. Der Anteil der Stromazellen verringert sich auf $27,9 \pm 1,0$ %, wohingegen der Anteil der Epithelzellen auf $60,9 \pm 1,9$ % steigt (Chatterjee et al., 2015). Der dem Lumen zugehörige Anteil sinkt auf $11,2 \pm 1,1$ %, wodurch das Gewebe an Dichte zunimmt.

Gewebetyp	Zellkerne pro mm ²
Gesundes Gewebe	
Periphere Zone	3299 ± 152
Zentrale Zone	3945 ± 153
Transitionalzone	3229 ± 194
Mittelwert	3527 ± 123
Prostatakarzinom	
Gleason-Score 3	4698 ± 169
Gleason-Score 4	4427 ± 138
Gleason-Score 5	4894 ± 170
Mittelwert	4628 ± 107

Tabelle 14 Zellkernflächendichte im Prostatagewebe aus (Chatterjee et al., 2015)

Um die volumenabhängige Zellzahl zu bestimmen, wurde eine Schichtdicke angenommen, welche dem mittleren Zelldurchmesser entspricht. Grundlage dieser Berechnung ist die Studie von Park et al., welche den mittleren Zelldurchmesser (Abbildung 6 β) verschiedener Prostatakarzinomzelllinien und zirkulierender Tumorzellen (CTC) von Patienten mit Prostatakarzinom bestimmten (Tabelle 15).

Zelltyp	Zelldurchmesser in μm
LNCaP	13 ± 3
PC3	15 ± 3
Durschnitt aller CTC	8 ± 2

Tabelle 15: Zelldurchmesser in Abhängigkeit des Zelltyps aus (Park et al., 2014)

Aus den oben genannten Daten wurde die mittlere volumenabhängige Zellzahl (N in ml^{-1}) berechnet (Abbildung 6 ϵ), wobei n die flächenabhängige Zellzahl (in mm^{-1}) und d den mittleren Zelldurchmesser (in mm) angibt.

$$N = n \div d \times 10^3 \quad (4.2)$$

4.2.13 Näherung einer in-vivo-Dosis aus in-vitro-Daten

Die Berechnung der Zellzahl im Metastasenvolumen erfolgte in Abhängigkeit des Gleason-Scores. Dafür wurden die von Chatterjee et al. in Abhängigkeit der Gleason-Scores bestimmte Zellzahl pro Quadratmillimeter durch den mittleren Durchmesser einer LNCaP- oder PC3-Zelle geteilt (Park et al., 2014). Der Querdurchmesser der für die in-vitro-Experimente verwendeten LNCaP- und PC3-Zellen lag mit circa $15\mu\text{m}$ nahe den von Park et al. gemessenen Werten. Der Längsdurchmesser der verwendeten Zellen war hingegen mit ca. $50\mu\text{m}$ deutlich größer.

Um die kumulierte Aktivität im definierten Volumen zu erhalten, wurde die Zellzahl anschließend mit dem mittleren Metastasenvolumen des Patienten und mit der mit Hilfe der in-vitro-Versuche gemessenen Aktivität multipliziert. Unter Zuhilfenahme makroskopischer S -Werte (Abbildung 6 η) aus dem OLINDA-Programm² konnte eine Dosis rechnerisch ermittelt werden (Tabelle 16). Für die Metastase mit 12g wurde der S -Wert interpoliert.

Masse der Sphere (g)	S -Wert (mGy/MBq*h)
4	20
6	13
8	10
10	8
12	7
20	4

Tabelle 16: Makroskopische S -Werte einer Kugelsphäre für $[^{177}\text{Lu}]\text{Lutetium}$ aus dem OLINDA-Programm

² Die S -Werte wurde über den Dosisfaktor und die Number of Disintegrations eines Beispiels berechnet und mit Hilfe eines weiteren Beispiels verifiziert.

5 Ergebnisse

5.1 Zusammenfassung und Bewertung der Vorversuche

Die in diesem Abschnitt erläuterten Vorversuche dienten der Überprüfung von Matrixeffekten sowie der allgemeinen Charakterisierung der Aufnahmekinetik der untersuchten Substanzen. Die Ergebnisse der Vorversuche sind im Anhang in Abschnitt 10.4.2 hinterlegt. Im Folgenden werden die wichtigsten Erkenntnisse als Basis für die Hauptversuche dargestellt.

Charakterisierung der nativen Zellen

Die Verdopplungszeit der LNCaP-Zellen in FKS-haltigem Zellkulturmedium lag in der logarithmischen Phase bei circa 48 h. Die Verdopplungszeit der PC3-Zellen wurde mit 30 h bestimmt.

Toxizität nicht radioaktiver Substanzen:

Nach Exposition der PC3-Zellen mit der Matrix des $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ konnte keine Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Abbildung 33). Somit kann eine Zytotoxizität der Matrix des $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ als Ursache eines möglicherweise verringerten Zellüberlebens nach Exposition der PC3-Zellen mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ ausgeschlossen werden. Zudem wurde auch durch eine Inkubation der LNCaP- und PC3-Zellen mit einer wässrigen Lutetium-II-Chlorid-Lösung, die keine Radionuklide enthielt, keine zytotoxische Wirkung erzielt, sodass eine mögliche Zytotoxizität des $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$ auf die Wirkung der ionisierenden Strahlung zurückzuführen ist.

Aufnahmekinetik und Zellüberleben nach Inkubation mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-I\&T}$:

Um einen möglichen Einfluss des PSMA-Liganden auf die zelluläre Bindung von $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA}$ an die LNCaP-Zellen zu eruieren, wurden diese für 24 h mit steigender Aktivitätskonzentration $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-I\&T}$ inkubiert. Es zeigte sich eine von der Aktivitätskonzentration abhängige Zunahme der zellulären Zählrate (Anhang Abbildung 36 Abbildung 37). Der Vergleich der zellulären Zählrate bei Inkubation mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ und $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-I\&T}$ zeigte bei gleicher Aktivitätskonzentration eine um den Faktor 1,5 höhere zellulär gebundenen Aktivitätsmenge bei Inkubation mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-I\&T}$ gegenüber

der Inkubation mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617. Trotz eines leicht unterschiedlichen Versuchsablaufs deuten diese Ergebnisse auf eine unterschiedliche Aufnahmekinetik der beiden PSMA-Varianten hin. Daher war ein Wechsel zwischen beiden Radiopharmaka innerhalb einer Studie nicht möglich.³ Die Inkubation der LNCaP-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-I&T zeigte zudem eine von der Aktivitätskonzentration abhängige Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit (Anhang Abbildung 37). Es konnte somit ein von der applizierten Dosis abhängiges Wachstum der LNCaP-Zellen gezeigt werden.

Methodenkontrolle der Durchflusszytometrie mittels Staurosporin zur Evaluation einsetzender Apoptose

Eine Behandlung mit Staurosporin führte in beiden Zelllinien in Abhängigkeit der Staurosporinkonzentration und der Inkubationszeit zu einem signifikanten Anstieg der Zellen in der apoptotischen (Sub-G1-) Fraktion. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Apoptose in LNCaP- und PC3-Zellen mittels Staurosporin grundsätzlich möglich ist, mit der gewählten Methode nachweisbar ist und in ihrem Ausmaß von der Staurosporinkonzentration sowie von der Inkubationszeit beeinflussbar ist. Es wurde gezeigt, dass das in Abschnitt 10.4.1.3 beschriebene Protokoll unter Verwendung von 7AAD zum Nachweis apoptotischer LNCaP- und PC3-Zellen geeignet ist. Der Anteil der LNCaP-Zellen in der G1- und G2-Phase nahm nach Exposition mit Staurosporin ab. Bei Exposition der PC3-Zellen mit 2,5µm Staurosporin war hingegen eine Zunahme der Zellen in der G2-Phase bei Abnahme der Zellen in der G1-Phase zu beobachten. Als Ursache des Anstiegs der PC3-Zellen in der G2-Phase nach Exposition mit Staurosporin ist ein Arrest der Zellen in der G2-Phase denkbar (Abe et al., 1991). Möglicherweise wurde dieses Phänomen bei Exposition der LNCaP-Zellen mit Staurosporin durch den hohen Anteil an apoptotischen Zellen kaschiert.

³ Ab Januar 2020 stand PSMA-617 überraschend auf dem deutschen Markt nicht mehr für eine Radiomarkierung zur Verfügung. Daher konnten die Versuche ab diesem Zeitpunkt nicht mehr fortgesetzt werden. Ein Wechsel des Radiopharmakons hätte die Wiederholung aller bis dato durchgeführten Experimente bedeutet und war im Rahmen der für die Anfertigung der Promotionsarbeit vorgesehenen Zeit von etwa 2 Jahren nicht zu leisten.

Blutpoolkonzentration

Der steilste Abfall der Blutpoolkonzentration von [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 zeigte sich innerhalb der ersten zwei Stunden (Anhang Abbildung 42). 24 h nach Therapiebeginn waren lediglich noch 10 % der 30 min nach Therapiebeginn im Blut gemessenen Aktivität nachweisbar. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das mit den Radiopharmaka versetzte Zellkulturmedium nach 24 h entfernt.

5.2 Ergebnisse der Vorversuche, welche die Grundlage zur Durchführung der Hauptversuche darstellten

1. Die nativen Zelllinien PC3 und LNCaP wurden bezüglich ihrer Wachstumskinetik charakterisiert.
2. Zytotoxische Eigenschaften von Versuchsparametern neben dem eigentlichen Untersuchungsobjekt, dem Radiopharmakon [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617, wurden untersucht. Es wurde gezeigt, dass weder die Matrix des Radiopharmakons noch Lutetium messbare chemisch-toxische Eigenschaften besitzen.
3. Es wurde für die untersuchten Zelllinien gezeigt, dass eine Apoptosebestimmung mittels 7AAD-basiertem FACS für die Zelllinien PC3 und LNCaP grundsätzlich möglich ist.
4. Mittels 7AAD-FACS ist der Nachweis eines G2-Phase-Arrests unter apoptose-induzierenden Bedingungen möglich.
5. Die PSMA-Varianten [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 und [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-I&T unterscheiden sich bezüglich ihrer Aufnahmekinetik und ihrem Einfluss auf das Zellüberleben der LNCaP-Zellen, so dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine stringente Festlegung auf die Verwendung nur einer PSMA-Variante erfolgen musste: es wurde das PSMA-617 gewählt.

5.3 Aufnahmekinetik

Im Folgenden wird die zellulär gebundene Aktivitätsmenge in Abhängigkeit von der Aktivitätskonzentration im umgebenden Zellkulturmedium betrachtet (Abbildung 6 δ). Es wird dabei nicht zwischen membrangebundener und zytoplasmatischer Aktivität differenziert.

Exposition der LNCaP-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617⁴:

Die zellulär gebundene Menge an [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 zeigte sich abhängig von der angebotenen Aktivitätskonzentration. Mit zunehmender Aktivitätskonzentration stiegen die gemessene Zählraten pro Zelle an (Abbildung 10, Abbildung 11). Zudem konnte eine zeitabhängige Sättigungskinetik der Nuklidaufnahme beobachtet werden. Diese ließ sich unabhängig von der angebotenen Aktivitätskonzentration in nahezu gleichem Ausmaß reproduzieren.

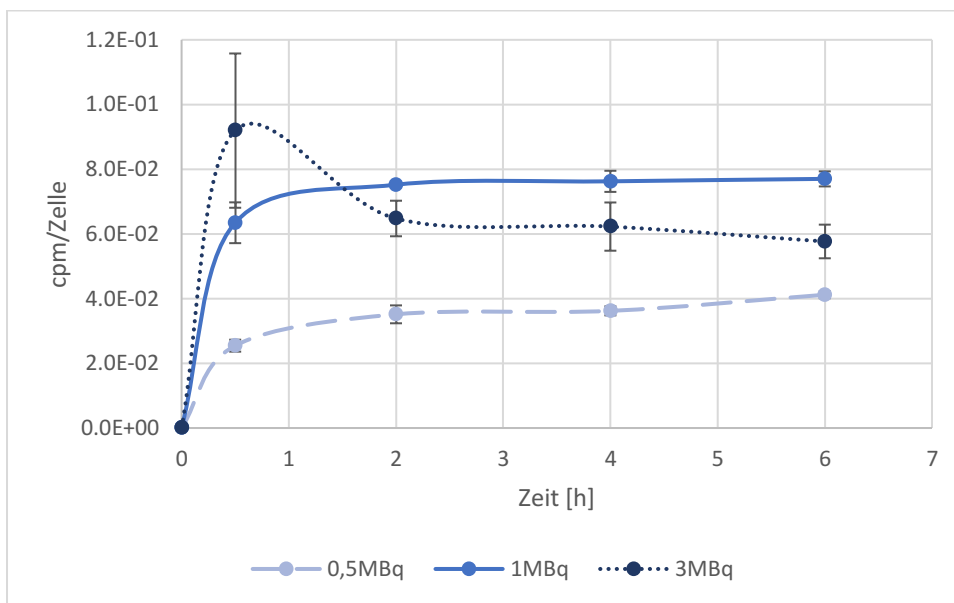


Abbildung 10: Gemessene Zählraten je LNCaP-Zelle für den Zeitraum 0-6 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617

⁴ In der vergleichenden Darstellung der durch die LNCaP-Zellen gebundenen Aktivität zeigt sich in allen Gruppen, dass die Leerwerte etwa um den Faktor 10 bis 100 unter der zellulär gebundenen Aktivität liegen. Daher werden die Leerwerte im Folgenden nicht näher betrachtet.

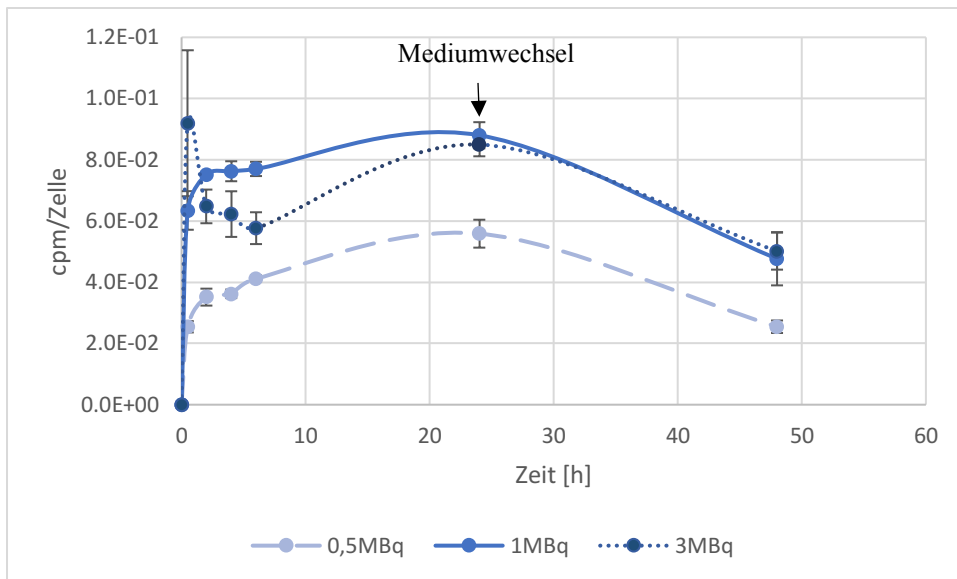


Abbildung 11: Gemessene Zählrate je LNCaP-Zelle für den Zeitraum 0-24 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml ^{177}Lu]Lu-PSMA-617

Exposition der LNCaP-Zellen mit dem ^{177}Lu]Lu-X-Komplex⁵:

Die Zählraten pro LNCaP-Zelle zeigten sich ebenfalls von der angebotenen Aktivitätskonzentration des ^{177}Lu]Lu-X-Komplex abhängig. Analog zur Exposition mit ^{177}Lu]Lu-PSMA-617 zeigte sich bereits zum Versuchszeitpunkt 30 min eine deutliche Differenz der zellulären Zählraten in Abhängigkeit der angebotenen Aktivitätskonzentration des ^{177}Lu]Lu-X-Komplex (Abbildung 12, Abbildung 13).

⁵ In der vergleichenden Darstellung der durch die LNCaP-Zellen gebundenen Aktivität zeigt sich in allen Gruppen, dass die Leerwerte etwa um den Faktor 10 bis 100 unter der zellulär gebundenen Aktivität liegen. Daher werden die Leerwerte im Folgenden nicht näher betrachtet.

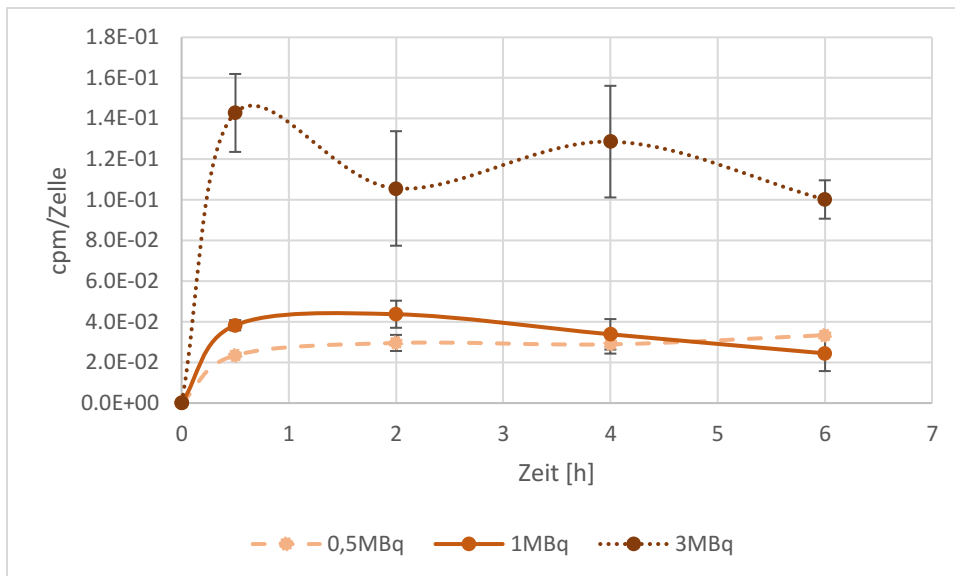


Abbildung 12: Gemessene Zählraten je LNCaP-Zelle für den Zeitraum 0-6 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$

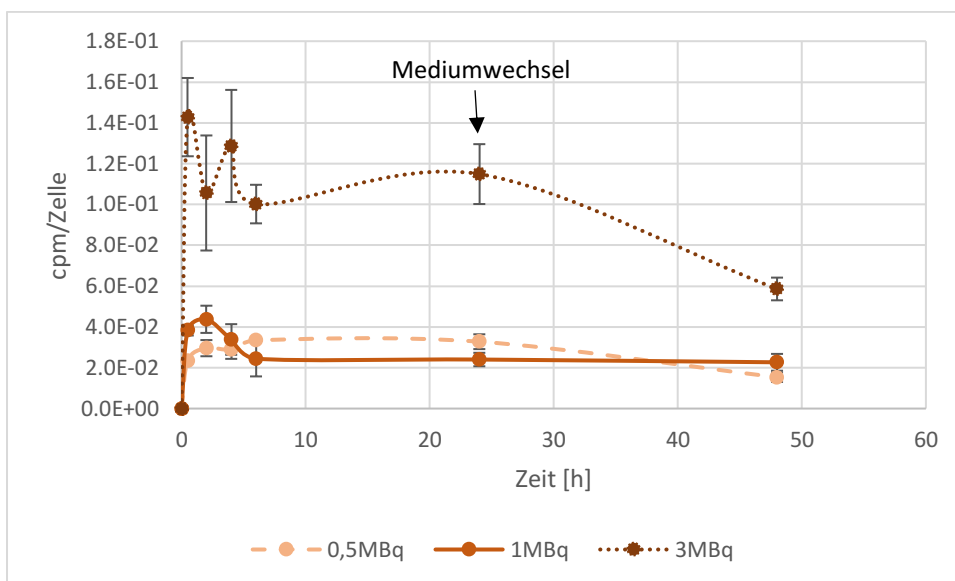


Abbildung 13: Gemessene Zählraten je LNCaP-Zelle für den Zeitraum 0-24 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$

Exposition der PC3-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617:

Die Ergebnisse analoger Untersuchungen an PC3-Zellen waren durch eine erhebliche Standardabweichung der zellulären Zählraten innerhalb einer Versuchsserie charakterisiert.⁶ Bei Exposition der PC3-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 konnte ein geringer Uptake beobachtet werden. Die zellulär gebundene Aktivität zeigte sich etwa um den Faktor 100 geringer als bei Inkubation der LNCaP-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617. Daher fielen die Leerwerte bei Exposition der PC3-Zellen im Vergleich zu den LNCaP-Zellen, deutlicher ins Gewicht (Abbildung 14). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt daher ohne Abzug der Leerwerte. Die gemessenen zellulären Zählraten entsprechen maximal dem doppelten Leerwert.

Bei Exposition der PC3-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 konnte in den ersten 6 h eine Kinetik ähnlich der mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 exponierten LNCaP-Zellen dargestellt werden. Bereits zum Versuchszeitpunkt 30 min zeigte sich ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen den gemessenen zellulären Zählraten und der angebotenen Aktivitätskonzentration. Die mit 0,5 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 exponierten PC3-Zellen zeigten nach Abzug der Leerwerte keine signifikante zelluläre Bindung der Aktivität.

⁶ Mit dem Ziel, die Größe der Standardabweichungen zu minimieren, wurde die Aufarbeitung der Proben geringfügig abgeändert. Beispielsweise wurde die Anzahl der Waschschrte mit PBS erhöht oder die Zellen vor Beginn der Waschschrte in ein Falcon-Röhrchen umgesetzt. Dies erschwerte den Vergleich der Versuche untereinander. Um eine vergleichende Darstellung zu ermöglichen, werden die Ergebnisse eines Versuchs dargestellt, in welchem die Aktivitätsaufnahme aller drei Aktivitätskonzentrationen zeitgleich bestimmt wurde. Aufgrund der kurzen zeitlichen Messintervalle konnten dabei keine technischen Replikate mitgeführt werden.

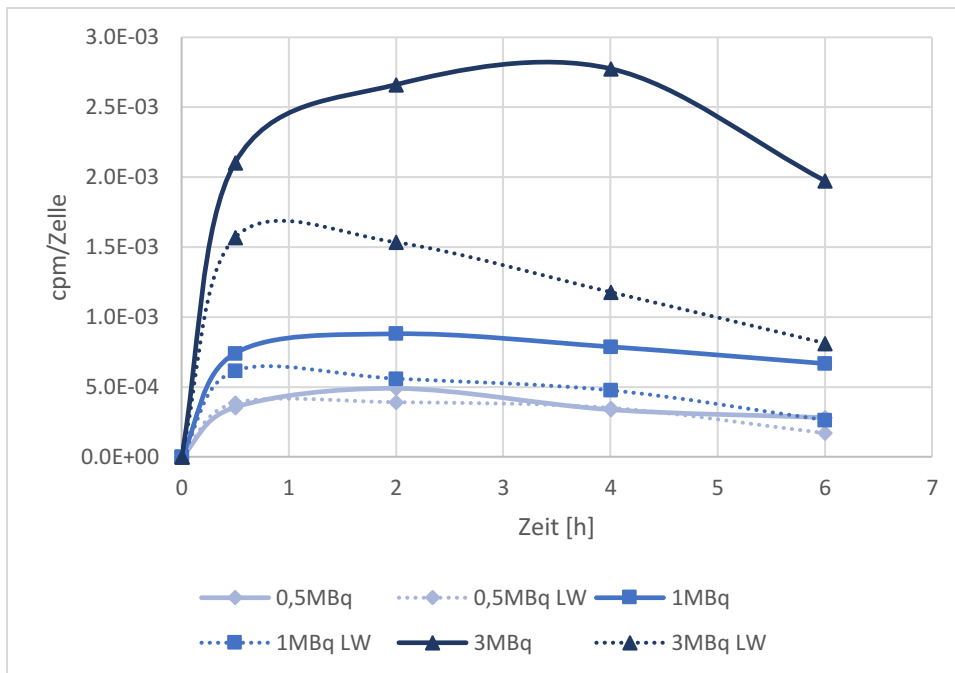


Abbildung 14 Gemessene Zählrate je PC3-Zelle inklusive Leerwerten für den Zeitraum 0-6 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$

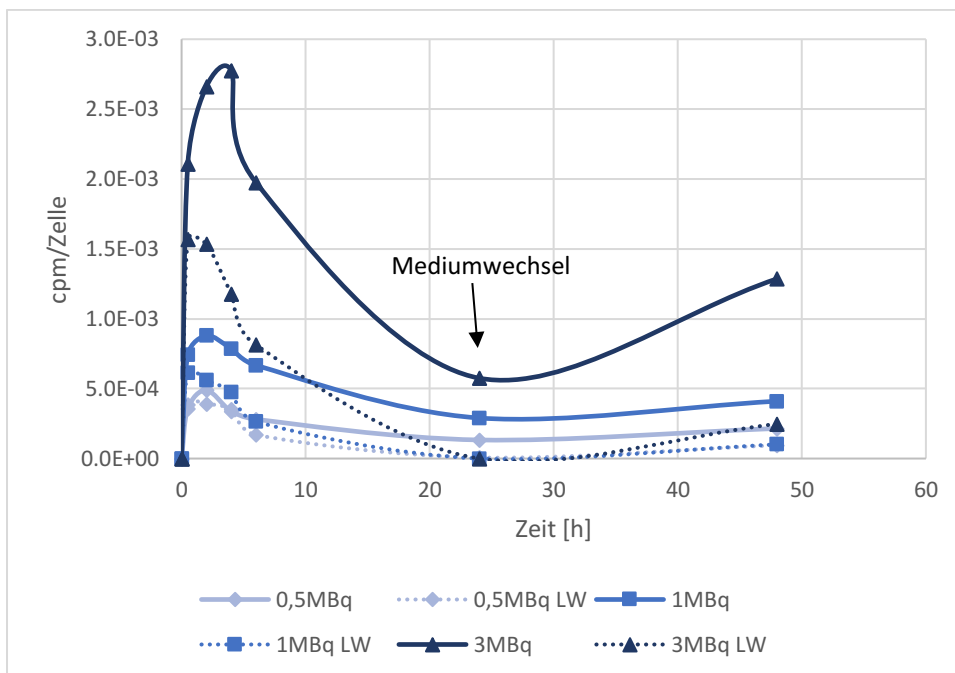


Abbildung 15: Gemessene Zählrate je PC3-Zelle inklusive Leerwerten für den Zeitraum 0-24 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$

Exposition der PC3-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex:

Analog zu den Ergebnissen der mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 exponierten PC3-Zellen zeigten sich auch bei Exposition mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex hohe Leerwerte. Die Messwerte der mit 0,5 MBq/2 ml exponierten Zellen lagen im Bereich der Leerwerte. Die zellulären Zählraten der mit 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml exponierten Zellen entsprachen innerhalb der ersten 2 h in etwa dem doppelten Leerwert, näherten sich diesem aber zunehmend an.

Auch bei der Inkubation der PC3-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex zeigte sich die zelluläre Zählrate direkt proportional zu der angebotenen Aktivitätskonzentration (Abbildung 16). In allen drei Gruppen wurde zum Versuchszeitpunkt 30 min die maximale zelluläre Zählrate erreicht. In den folgenden 24 h konnte unabhängig von der Aktivitätskonzentration ein kontinuierlicher Abfall der zellulär gebundenen Aktivität auf Werte nahe den Leerwerten verzeichnet werden (Abbildung 17). Nach Entfernung des aktiven Mediums blieb die zellulär gebundene Aktivität konstant niedrig.

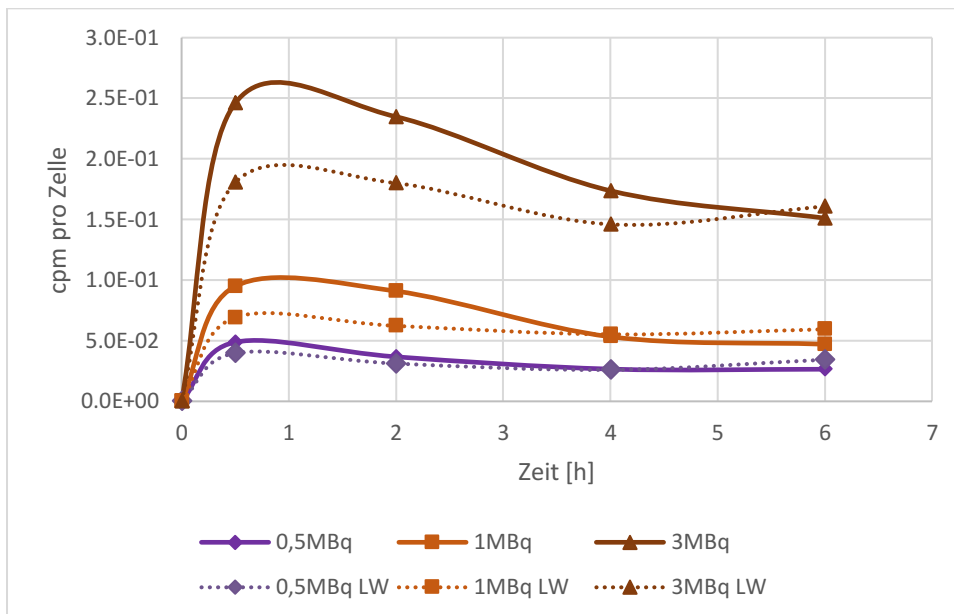


Abbildung 16: Gemessene Zählraten je PC3-Zelle inklusive Leerwerten für den Zeitraum 0-6 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex

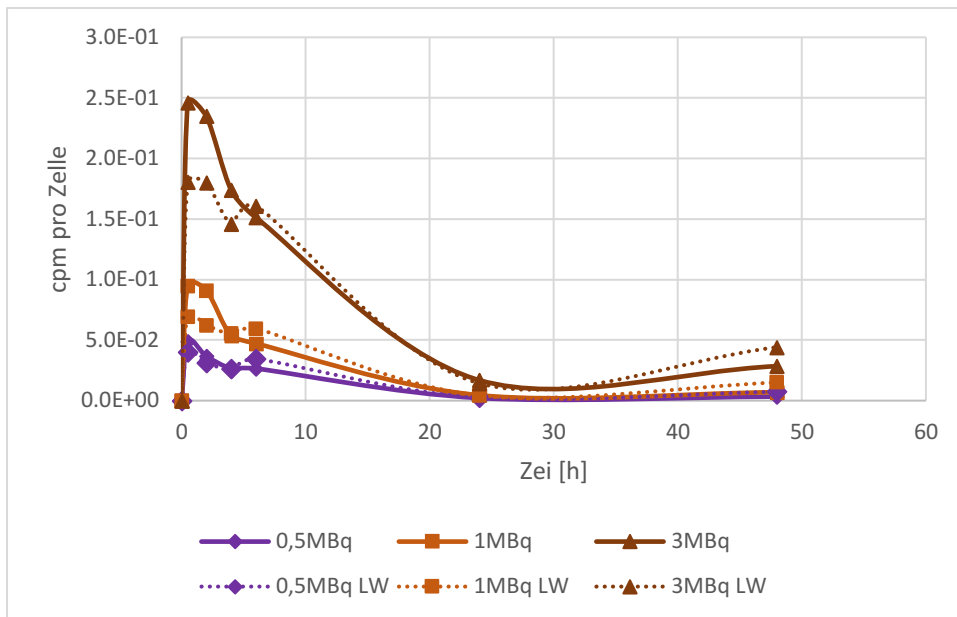


Abbildung 17: Gemessene Zählraten je PC3-Zelle inklusive Leerwerten für den Zeitraum 0-24 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml ^{177}Lu Lu-X-Komplex

5.4 Bindungsspezifität und Internalisierungskinetik

Ziel dieses Versuchs war die Differenzierung der zellulär gebundenen Aktivität in eine zytoplasmatische und eine membrangebundenen Fraktion sowie den Einfluss der Temperatur auf die Kinetik darzustellen um daraus Aussagen bezüglich der Bindungsspezifität und Internalisierungskinetik abzuleiten (Abbildung 6 δ). Die Versuchsergebnisse der PC3-Zellen die - wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt - durch eine nicht-signifikante [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617-Aufnahme charakterisiert sind, sind in Kapitel 10.5.1 hinterlegt.

Inkubation der LNCaP-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617:

Die membrangebundenen Aktivität der LNCaP-Zellen wurde zum Versuchszeitpunkt 2 h nach Beginn der Inkubation mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 bei 37 °C mit 42 % der Gesamtaktivität bestimmt (Abbildung 18A). Bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 5 h nahm die membrangebundene Fraktion von auf 16 % zu Gunsten der zytoplasmatischen Fraktion ab. Die absolut an die LNCaP-Zellen gebundene Aktivität zeigte sich unabhängig von der Inkubationszeit.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation vergleichend bei 37°C und 4°C (Abbildung 18B). Durch Reduktion der Temperatur auf 4 °C verringerte sich die zytoplasmatische Fraktion in beiden Gruppen.

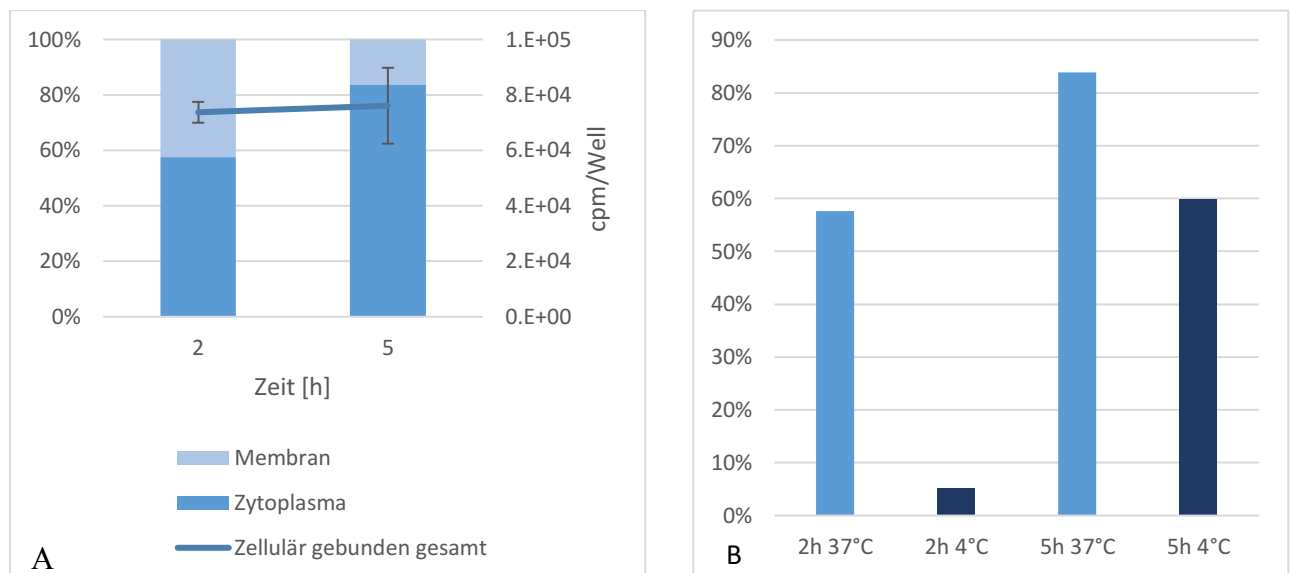


Abbildung 18: A: Darstellung der membrangebundenen und zytoplasmatischen Fraktion sowie die absolute zellulär gebundenen Aktivität der LNCaP-Zellen nach Exposition mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 bei 37 °C; B: Darstellung der zytoplasmatischen Fraktion der zellulär gebundenen Aktivität der LNCaP-Zellen nach Exposition mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 bei 37 °C und 4 °C

Inkubation der LNCaP-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex:

Bei Inkubation der LNCaP-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex stieg der prozentuale Anteil der zytoplasmatische Fraktion über den Versuchszeitraum von 5 h konstant an (Abbildung 19A). Nach 45 min Inkubationszeit waren 99 % der zellulär gebundenen Aktivität in der Membranfraktion lokalisiert. Mit zunehmender Inkubationszeit fiel der membrangebundene Anteil zugunsten der zytoplasmatischen Fraktion ab.

Bei Inkubation der LNCaP-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex zeigte sich durch Verringerung der Temperatur von 37 °C auf 4 °C eine Abnahme der zytoplasmatischen Fraktion der zellulär gebundenen Aktivität.

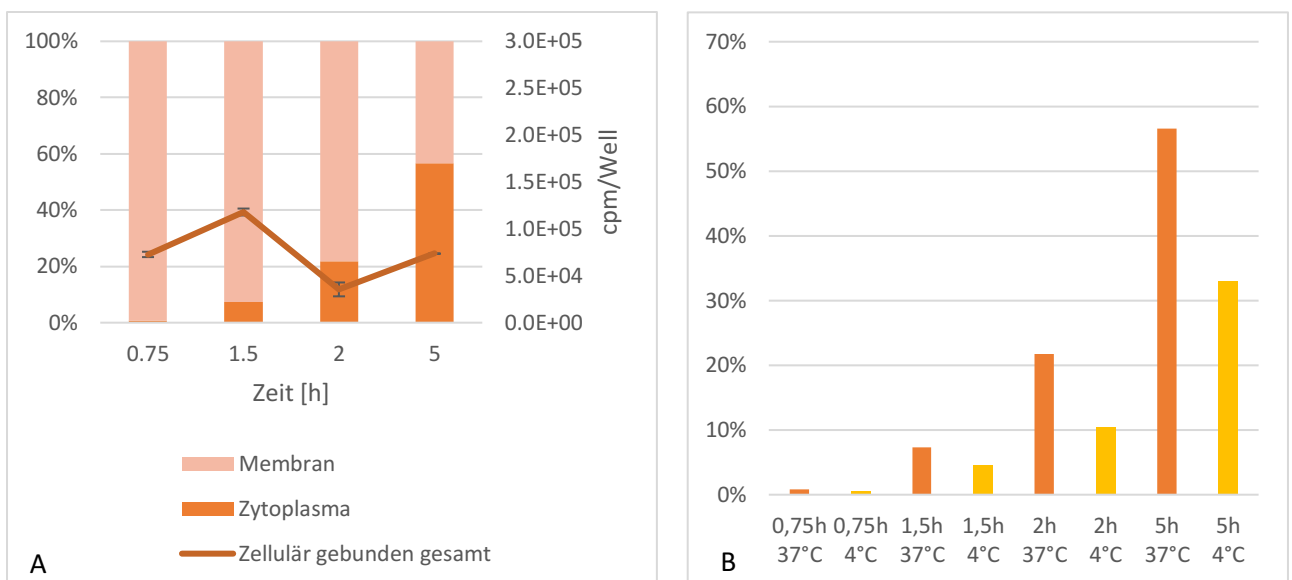


Abbildung 19: A: Darstellung der membrangebundenen und zytoplasmatischen Fraktion sowie die absolute zellulär gebundenen Aktivität der LNCaP-Zellen nach Exposition mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex bei 37 °C; B: Darstellung der zytoplasmatischen Fraktion der zellulär gebundenen Aktivität der LNCaP-Zellen nach Exposition mit [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex bei 37 °C und 4 °C

5.5 Dosis-Wirkungs-Beziehungen

5.5.1 Zellüberlebenskurven

Der primäre Endpunkt der Aufnahme-Versuche war die Beobachtung des Zellüberlebens nach Exposition mit den Radiopharmaka $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ und $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$ (Abbildung 6 ξ).

Inkubation der LNCaP-Zellen mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$:

Bei Exposition der LNCaP-Zellen mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Zellzahl zwischen den bestrahlten Zellen und der Kontrollgruppe. Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen der Höhe der Aktivitätskonzentration und der Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit festgestellt werden (Abbildung). Nach 24 h war bereits ein Effekt der Bestrahlung zu beobachten, allerdings unabhängig von der angebotenen Aktivitätskonzentration.

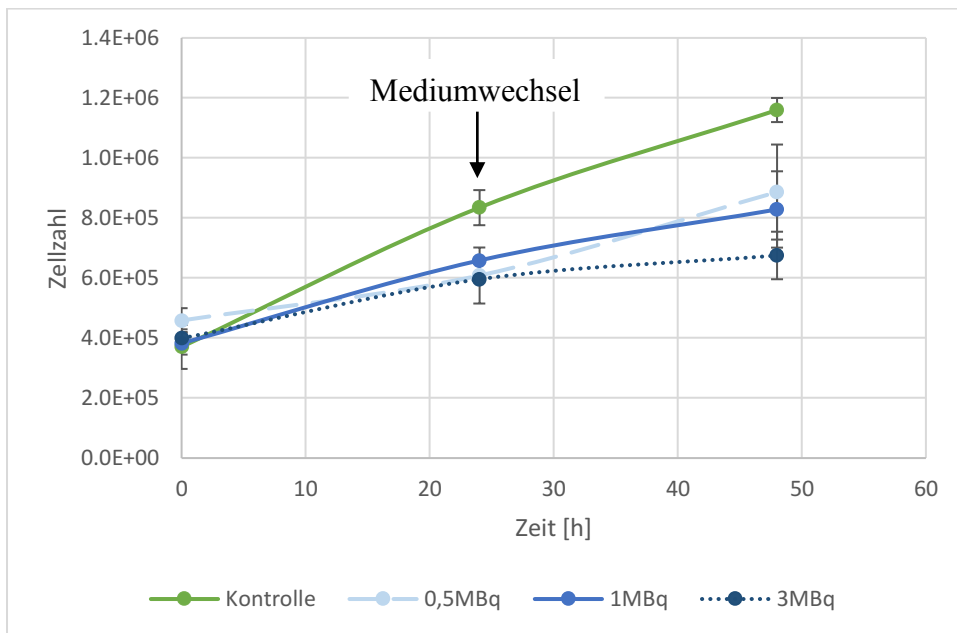


Abbildung Zellzahl der LNCaP-Zellen über 48 h nach Bestrahlung mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$

Inkubation der LNCaP-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex:

Bei Exposition der LNCaP-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex zeigte sich analog zur Exposition mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 ein geringerer Anstieg der Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 20). Dies war bereits zu Zeitpunkt 24 h nach Expositionsbeginn zu erkennen.

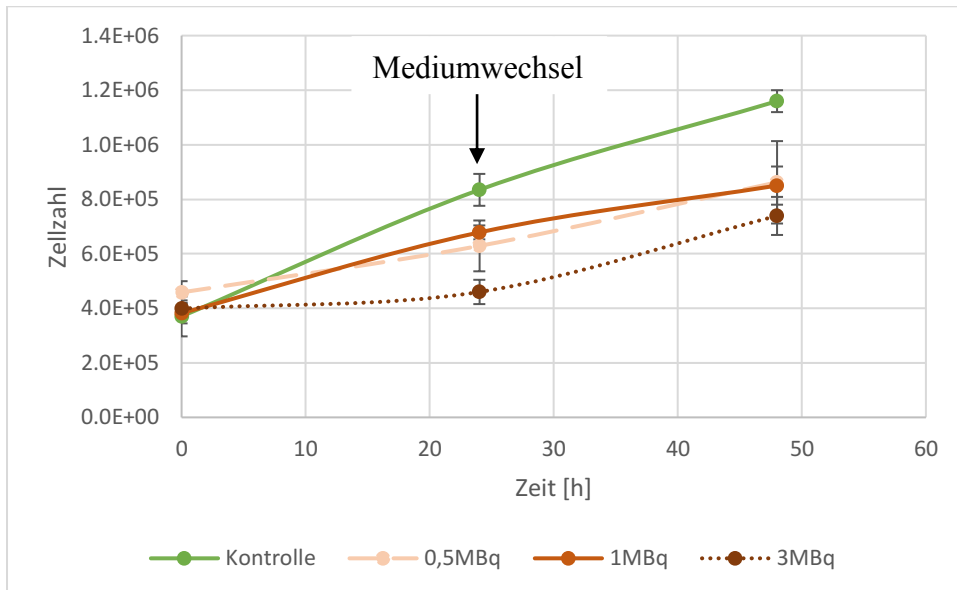


Abbildung 20 Zellzahl der LNCaP-Zellen über 48 h nach Bestrahlung mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex

Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit der LNCaP-Zellen nach Exposition mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 oder dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex:

Der Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit der mit den beiden Radiopharmaka exponierten LNCaP-Zellen mit der Kontrollgruppe zeigte in allen bestrahlten Gruppen eine verringerte Wachstumsgeschwindigkeit (Tabelle 17). Des Weiteren lag die Wachstumsgeschwindigkeit der mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 exponierten Zellen bei gleicher Aktivitätskonzentration unterhalb der mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex exponierten Zellen.

	$[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$		$[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$	
	Phase I	Phase II	Phase I	Phase II
Kontrolle	$4,6 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$
0,5 MBq/2 ml	$1,5 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$
1 MBq/2 ml	$2,8 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$
3 MBq/2 ml	$2,0 \times 10^5$	$7,9 \times 10^4$	$6,1 \times 10^4$	$2,8 \times 10^5$

Tabelle 17: Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten der LNCaP-Zellen in Phase I und II nach Exposition mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ oder dem $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$ in Zellzahl/24 h

Exposition der PC3-Zellen mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$:

Bei Exposition der PC3-Zellen mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Abbildung 21).

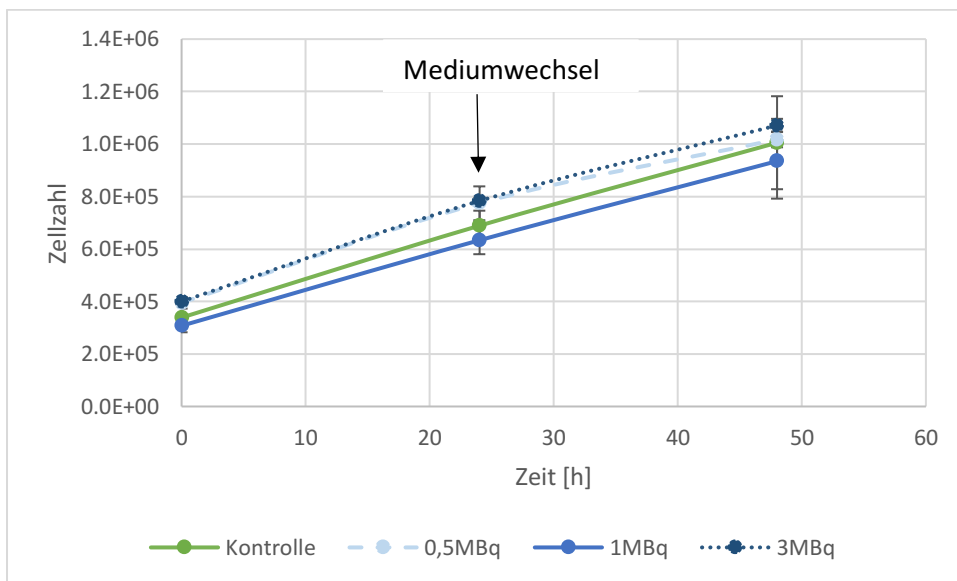


Abbildung 21: Zellzahl der PC3-Zellen über 48 h nach Bestrahlung mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$

Exposition der PC3-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex:

Bei Exposition von PC3-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex konnte ausschließlich bei Exposition mit 3 MBq/2 ml eine relevante Veränderung der Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 22).

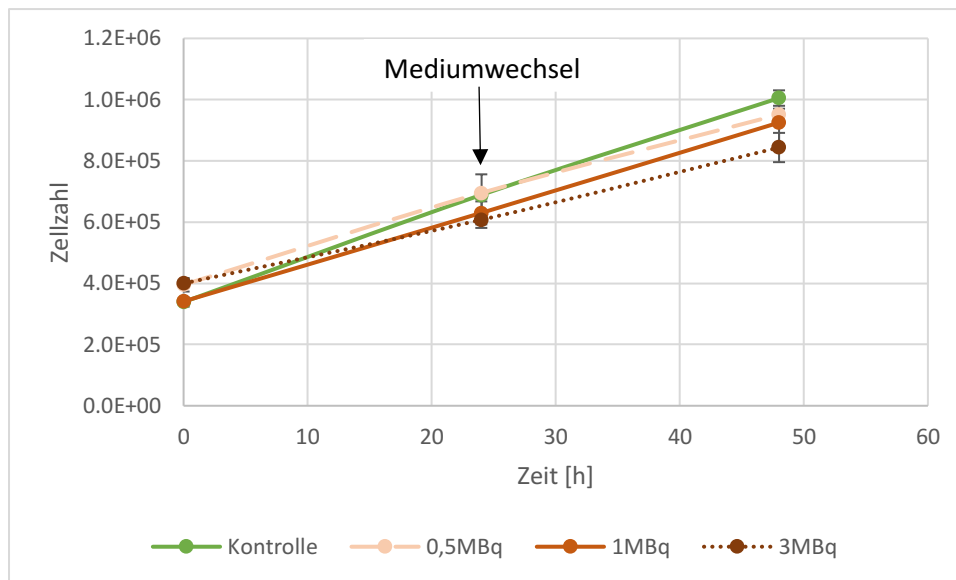


Abbildung 22 Zellzahlen der PC3-Zellen über 48 h nach Bestrahlung mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex

Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit der PC3-Zellen nach Exposition mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 oder dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex:

Beim Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten der mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 exponierten PC3-Zellen zeigte sich keine signifikant veränderte Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber der Kontrollgruppe (Tabelle 18). Des Weiteren lag die Wachstumsgeschwindigkeit der mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 exponierten Zellen bei gleicher Aktivitätskonzentration unterhalb der mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex exponierten Zellen.

	$[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$		$[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$	
	Phase I	Phase II	Phase I	Phase II
Kontrolle	$3,5 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$
0,5 MBq/2 ml	$2,9 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$
1 MBq/2 ml	$3,6 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$
3 MBq/2 ml	$3,7 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$

Tabelle 18 Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten der PC3-Zellen in Phase I und II nach Exposition mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ oder dem $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$ in Zellzahl/24 h

5.5.2 Durchflusszytometrie zur Evaluation einsetzender Apoptose nach Bestrahlung mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$

Um den Effekt der Bestrahlung auf zellulärer Ebene genauer zu charakterisieren, wurde für beide Zelllinien nach ihrer Exposition mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ eine Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt (Abbildung 6 o). Die Ergebnisse der Zellversuche an den PC3-Zellen sind in Abschnitt 10.5.2 hinterlegt.

Exposition der LNCaP-Zellen mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$:

Die Kontrollgruppe der LNCaP-Zellen war durch 0 % (SD ± 0 %) der Zellen in der Sub-G1-Fraktion, 61 % (SD ± 3 %) in der G1-Phase, 28 % (SD ± 4 %) in der S-Phase, 11 % (SD ± 2 %) in der G2-Phase sowie 2 % (SD ± 0 %) in der >G2-Fraktion gekennzeichnet.

Nach Exposition der LNCaP-Zellen mit 1 MBq/2 ml $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ zeigte sich eine diskrete Zunahme der Zellen in der G1- und G2-Phase sowie eine Abnahme der Zellen in der S-Phase (Abbildung 23). Der prozentuale Anteil der Zellen mit einem Chromosomensatz größer als jener in der G2-Phase blieb unverändert.

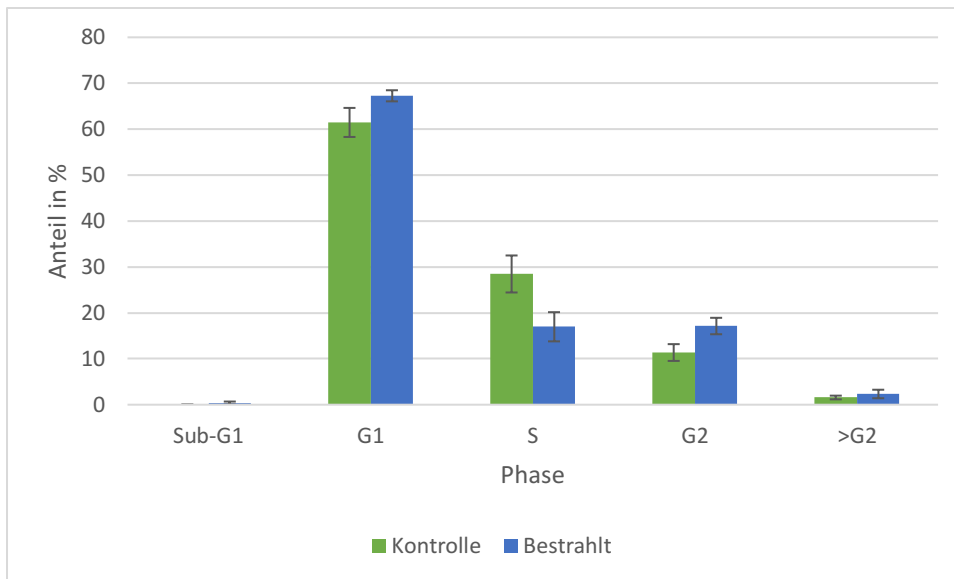


Abbildung 23: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen der LNCaP-Zellen 24 h nach Exposition mit 1 MBq/2 ml $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$

5.5.3 Vitalitätsbestimmung mittels $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$

In diesem Versuch wurde untersucht, ob eine vorherige Exposition mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ oder dem $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$ die $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -Aufnahme beeinflusst (Abbildung 6 π). 48 h nach Ende der 24-stündigen Exposition mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ oder dem $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$ wurde die Aufnahme von $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ in die LNCaP- und PC3-Zellen gemessen. Die Ergebnisse der Zellversuche an den PC3-Zellen sind in Abschnitt 10.5.3 hinterlegt.

Exposition der LNCaP-Zellen mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$:

Die Kontrollgruppe der mit $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ exponierten Zellen zeigte eine Aufnahme von $3,5 \times 10^{-1}$ cpm/Zelle (SD $\pm 6,3 \times 10^{-2}$) bzw. $5,2 \times 10^5$ cpm/Well (SD $\pm 7,4 \times 10^4$). Die Zählrate der mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ exponierten Kontrollgruppe lag bei $5,3 \times 10^{-1}$ (SD $\pm 5,4 \times 10^{-1}$) cpm/Zelle bzw. $7,4 \times 10^5$ cpm/Well (SD $\pm 1,1 \times 10^4$). Die Zählrate der mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ und $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ exponierten Zellen lag bei $3,6 \times 10^{-1}$ cpm/Zelle (SD $\pm 8,6 \times 10^{-2}$) bzw. $4,8 \times 10^5$ cpm/Well (SD $\pm 8,7 \times 10^4$) (Abbildung 24 A, B).

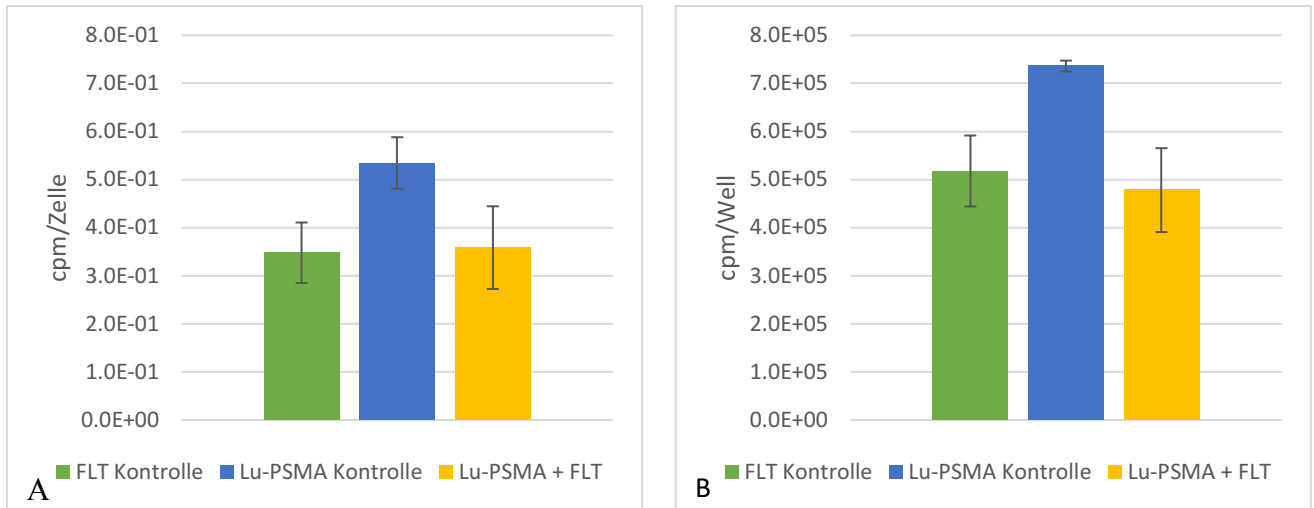


Abbildung 24: zelluläre Zählrate in **A** cpm/Zelle **B** cpm/Well 48h nach Exposition der LNCaP-Zellen mit entweder $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ (FLT Kontrolle) oder $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ (Lu-PSMA Kontrolle) oder beiden Radionukliden (Lu-PSMA + FLT), gemessen im $[^{18}\text{F}]\text{-Kanal}$

Exposition der LNCaP-Zellen mit dem $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$:

Die Kontrollgruppe der mit $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ exponierten Zellen zeigte eine Aufnahme von $3,5 \times 10^{-1}$ cpm/Zelle (SD $\pm 6,3 \times 10^{-2}$) bzw. $5,2 \times 10^5$ cpm/Well (SD $\pm 7,4 \times 10^4$). Die Kontrollgruppe der mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$ exponierten Zellen erreichte eine Zählrate von $3,3 \times 10^{-1}$ (SD $\pm 6,2 \times 10^{-2}$) cpm/Zelle bzw. $4,0 \times 10^5$ cpm/Well (SD $\pm 8,0 \times 10^4$). Nach Exposition der LNCaP-Zellen mit dem $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$ und $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ zeigte sich eine Zählrate von $5,4 \times 10^{-1}$ (SD $\pm 1,1 \times 10^{-1}$) cpm/Zelle bzw. $6,3 \times 10^5$ cpm/Well (SD $\pm 5,9 \times 10^4$) (Abbildung 25 A, B).

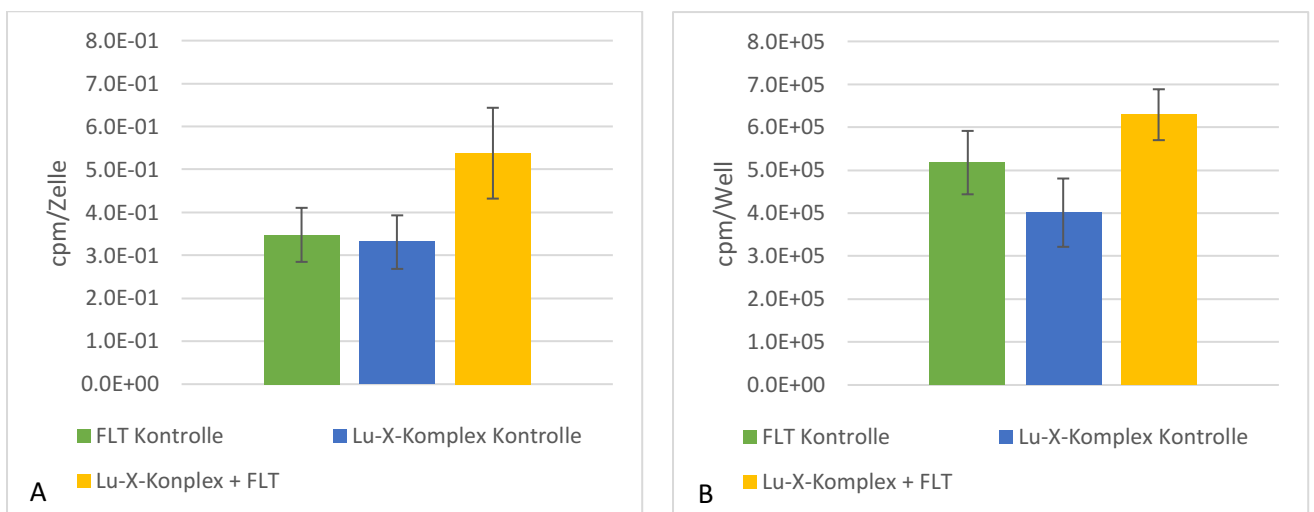


Abbildung 25: Darstellung der zellulären Zählrate in **A** cpm/Zelle **B** cpm/Well 48h nach Exposition der LNCaP-Zellen mit entweder $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ (FLT Kontrolle) oder $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$ (Lu-X-Komplex Kontrolle) oder beiden Radionukliden (Lu-X-Komplex + FLT), gemessen im $[^{18}\text{F}]\text{-Kanal}$

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Exposition mit 1 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 oder dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex weder bei den PC3- noch bei den LNCaP-Zellen zu einer mit der gewählten Methode nachweisbaren, statistisch signifikanten Veränderung der [¹⁸F]FLT-Aufnahme führt.

5.6 Dosisberechnung basierend auf den zellulären Aufnahmeversuchen

Die Berechnungen der zellulären Dosis erfolgte auf der Basis des in den Aufnahmeversuchen beobachteten Verhältnisses zwischen dem membrangebundenen und dem internalisierten [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 bzw. [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex. Hierfür wurden *S*-Werte unterschiedlicher Autoren verwendet (Tabelle 19). Vergleichend sind zudem die mittlere Zelldosis sowie die Dosis des Zellkerns dargestellt.

Auf Basis der *S*-Werte von Mansoury et al., welche mit Hilfe von Monte Carlo Simulationen berechnet wurden, ergab sich folgende Dosisverteilung. Eine Verdoppelung der Aktivitätskonzentration von 0,5 MBq/2 ml auf 1 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 bei Exposition der LNCaP-Zellen, bewirkte nahezu eine Verdoppelung der Gesamtdosis. Eine weitere Erhöhung der Aktivitätskonzentration auf 3 MBq/2 ml bewirkte hingegen weder einen weiteren Anstieg der Dosis für die gesamte Zelle noch für den Zellkern als Zielregion. Bei Exposition der LNCaP-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex konnte bei Steigerung der Aktivitätskonzentration eine stete Zunahme der Dosis beobachtet werden, jedoch kein linearer Zusammenhang. Die Exposition der LNCaP-Zellen mit 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex führte mit 10,5 Gy für die gesamte Zelle und 4,0 Gy für den Zellkern zu der höchsten Dosis aller Proben. Die mit 0,5 MBq [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 exponierten PC3-Zellen zeigten mit einer Gesamtdosis von 0,05 Gy für die gesamte Zelle und 0,02 Gy für den Zellkern die geringste Dosis aller Gruppen.

Vergleichend ist die kumulierte Aktivität (Abbildung 6 λ) sowie Gesamtdosis im Zellkern (Abbildung 6 ν) mit Hilfe der *S*-Werte von Tamborino et al. berechnet (Tabelle 19). Die Autoren verwendeten zur Berechnung der *S*-Werte einen Kegelstumpf anstelle einer Kugel, sowie eine Mesh Struktur auf der Basis von neun 3D-mikroskopischen Abbildungen der untersuchten Zellen. Die Gesamtdosis der mit Hilfe der *S*-Werte von Tamborino et al. berechneten Dosis für den Zellkern lag in allen Gruppen unterhalb der mit Hilfe der *S*-Werte Mansoury et al. berechneten Dosis. Die Dosisberechnungen für den Zellkern unter Verwendung

der S-Werte für die Mesh-Strukturen ergab die geringste Dosis unter allen verwendeten S-Werten.

Zelllinie	Radio-pharmakon	Aktivitäts-Konzentration [MBq/2 ml]	Kumulierte Aktivität pro Zelle [MBq*s] (λ)	S-Werte nach Mansoury et al. und Chan et al.		S-Werte nach Tamborino et al.	
				Gesamtdosis (extrapoliert auf 72h) [Gy]		Gesamtdosis (extrapoliert auf 72h) [Gy]	
				Zelle MIRD	Zellkern MIRD	Zellkern Kegelstumpf	Zellkern Mesh Strukturen
LNCaP	$[^{177}\text{Lu}]\text{LuPSMA-617}$	0,5	$2,0 \times 10^{-6}$	3,8	2,0	1,3	0,5
		1	$3,2 \times 10^{-6}$	6,2	3,2	2,0	0,9
		3	$2,8 \times 10^{-6}$	5,5	2,8	1,8	0,8
	$[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$	0,5	$1,5 \times 10^{-6}$	3,2	1,3	0,9	0,4
		1	$2,0 \times 10^{-6}$	4,5	1,7	1,2	0,5
		3	$4,7 \times 10^{-6}$	10,5	4,0	2,9	1,3
PC3	$[^{177}\text{Lu}]\text{LuPSMA}$	0,5	$2,0 \times 10^{-8}$	0,1	0,1	0,0	0,0
		1	$2,4 \times 10^{-8}$	0,1	0,1	0,0	0,0
		3	$8,8 \times 10^{-8}$	0,2	0,1	0,1	0,0
	$[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$	0,5	$4,3 \times 10^{-7}$	0,1	0,4	0,3	0,1
		1	$8,9 \times 10^{-7}$	2,0	0,7	0,5	0,2
		3	$3,0 \times 10^{-7}$	6,7	2,5	1,8	0,8

Tabelle 19: Zelluläre Gesamtdosis extrapoliert auf 72 h unter Verwendung unterschiedlicher S-Werte ($C \leftarrow C_s$) + ($C \leftarrow C$) + ($N \leftarrow C_s$) + ($N \leftarrow C$) + ($C \leftarrow C'$); Die Standardabweichung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Sie beträgt im Mittel 25 %

	Aktivitätskonzentration [Bq*s/cm ³]
Zelle	$1,6 \times 10^{13}$
Zellkulturmedium	$2,1 \times 10^{10}$

Tabelle 20: Aktivitätskonzentration intrazellulär und im Zellkulturmedium nach Exposition der LNCaP-Zellen mit 0,5 MBq/2 ml $[^{177}\text{Lu}]\text{LuPSMA-617}$

Vergleichend wurde exemplarisch die kumulierte Aktivitätskonzentration intrazellulär und im Zellkulturmedium bei Exposition der LNCaP-Zellen mit 0,5 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]LuPSMA-617 berechnet. Tabelle 20 zeigt eine um etwa den Faktor 700 höhere Aktivitätskonzentration intrazellulär als im Zellkulturmedium. Somit fiel der in Tabelle 21 gezeigt Beitrag des Zellkulturmediums zur zellulären Gesamtdosis entsprechend gering aus. Bei einer Aktivitätskonzentration von 0,5 MBq/2 ml lag der Dosisbeitrag pro Zelle bei 0,002 Gy. Eine Verdoppelung bzw. Verdreifachung der Aktivitätskonzentration führte erwartungsgemäß zu einer Verdoppelung bzw. Verdreifachung der Dosis durch das Zellkulturmedium.

Aktivitäts-Konzentration [MBq/2 ml]	Dosisbeitrag durch [¹⁷⁷Lu]Lutetium-haltiges Zellkulturmedium [Gy]
0,5	0,002
1	0,004
3	0,013

Tabelle 21: Dosisbeitrag pro Zelle durch [¹⁷⁷Lu]Lutetium-haltiges Zellkulturmedium

5.7 Dosisberechnung für eine Metastase im Patienten

Um die Dosisberechnungen aus den eigenen Experimenten mit klinischen Daten zu vergleichen, wurde exemplarisch die Gesamtdosis nach einem Zyklus [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 in zwei Metastasen bestimmt. Da das Prostatakarzinom sowohl in Knochen- als auch Weichteilgewebe metastasiert, wurde jeweils eine Knochen- und eine Weichteilmetastase gewählt.

5.7.1 Weichteilmetastase

Bei Patient 1 handelte es sich um einen Mann mittleren Alters, welcher an einem metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinom erkrankte. Er erhielt bei einer Größe von 1,85 m und einem Gewicht von 95 kg 4571 MBq [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617. Die Weichteilmetastase lag im kleinen Becken links dorsolateral der Harnblase mit einem Volumen (Abbildung 6 γ) von 12 ml (Anhang Abbildung 54).

Mit Hilfe der SPECT-Daten zum Zeitpunkt 2 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Therapiebeginn wurde die kumulative Aktivitätsaufnahme in der Metastase berechnet (Tabelle 22). Anschließend erfolgte die Dosisberechnung mit OLINDA. Um die Gesamtzahl der radioaktiven Zerfälle im Zielvolumen zu ermitteln, wurde eine Funktion des relevanten Uptakes über die Zeit aufgestellt (Anhang Abbildung 55). Für Patient 1 ergab sich hieraus eine Number of Disintegrations von 1,8 MBq*h/MBq.

	2h	24h	48h	72h
Volumen [ml]	13	14	11	9
Aufgenommene Aktivität [MBq]	45	66	57	39
Relative Aufnahme [%]	0,9	1,5	1,2	0,8

Tabelle 22: Relevante Daten der Weichteilmetastase von Patient 1 zum Aufnahmezeitpunkt 2 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Injektion

Die weitere Dosisberechnung erfolgte auf Basis eines sphärischen Metastasenmodells unter der Annahme einer mittleren Gewebedichte von 1 g/ml. Somit errechnete sich die applizierte mittlere Gesamtdosis dieser Metastase für Patient 1 zu 55 Gy (Tabelle 23).

Mittleres Metastasenvolumen	12 ml
Number of Disintegrations	1,8 MBq*h/MBq
Applizierte Aktivität	4571 MBq
Dosis je applizierter Aktivität	12 Gy/GBq
Kumulierte Aktivität im Zielvolumen (ζ)	8182 MBq*h
Gesamtdosis im Zielvolumen	55 Gy

Tabelle 23 Maßzahlen zur Berechnung der Gesamtdosis in der Weichteilmetastase von Patient 1

5.7.2 Knochenmetastase

Patient 2, dessen CT- und SPECT-Aufnahmen für die vergleichenden Dosisberechnungen herangezogen werden, war ebenfalls an einem metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinom erkrankt. Er erhielt bei einer Körpergröße von 1,74 m und einem Gewicht von 102 kg eine Gesamtaktivität von 6063 MBq [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617. Grundlage der nachfolgenden Berechnungen war eine ossäre Metastase im Os sacrum mit einem Volumen (Abbildung 6 γ) von 6 ml (Anhang Abbildung 56).

Mit Hilfe der SPECT-Daten zum Zeitpunkt 2 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Therapiebeginn wurde analog zu dem bei Patient 1 beschriebenen Vorgehen, die kumulierte Aktivitätsaufnahme in der Metastase berechnet (Tabelle 24).

	2h	24h	48h	72h
Volumen [ml]	5,1	5,6	6,4	5,0
Aufgenommene Aktivität [MBq]	25	67	70	46
Relative Aufnahme [%]	0,4	1,1	1,1	0,9

Tabelle 24: Relevante Daten der Knochenmetastase von Patient 2 zum Aufnahmezeitpunkt 2 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Injektion

Mit Hilfe von OLINDA wurde eine Number of Disintegrations von 1,2 MBq*h/MBq berechnet. Die weitere Dosisberechnung erfolgte ebenfalls auf der Basis eines sphärischen Metastasenmodells. Auf der Basis der in Tabelle 25 dargestellten Maßzahlen wurde für die Knochenmetastase von Patient 2 eine applizierte Gesamtdosis von 97 Gy berechnet.

Mittleres Metastasenvolumen	6 ml
Number of Disintegrations	1,2 MBq*h/MBq
Applizierte Aktivität	6063 MBq
Dosis je applizierter Aktivität	16 Gy/GBq
Kumulierte Aktivität im Zielvolumen (ζ)	7275 MBq*h
Gesamtdosis im Zielvolumen	97 Gy

Tabelle 25: Maßzahlen zur Berechnung der Gesamtdosis in der Metastase von Patient 2

5.8 Näherung einer in-vivo-Dosis aus in-vitro-Daten

Die Tabelle 26 zeigt die auf der Basis der Ergebnisse der in-vitro-Versuche berechneten kumulierten Aktivitäten in Metastasen mit 12 ml oder 6 ml Volumen. Die jeweilige Höhe der ermittelten kumulierten Aktivität wurde maßgeblich durch die Zellart bestimmt. Hierfür wurde entweder der von Park et al. gemessene Zelldurchmesser der LNCaP-Zellen verwendet oder der mittlere Durchmesser der in dieser Studie bestimmten zirkulierenden Tumorzellen. Da diese mit circa 8µm Durchmesser erheblich kleiner waren als die LNCaP- (13 µm) und PC3- (15 µm) Zellen es waren, zeigte sich die kumulierte Aktivität etwa um den Faktor zwei differierend.

Die Tabelle 27 zeigt die Ergebnisse der im Anschluss berechneten Dosis für eine hypothetische Metastase mit einem Volumen von 12 ml oder 6 ml. Die berechnete Dosis in einer hypothetischen Metastase mit 12 ml Volumen und der Zellgeometrie sowie Aufnahmekinetik der LNCaP-Zellen reichte je nach verwendetem Radiopharmakon und Aktivitätskonzentration von 57 Gy bis zu maximal 232 Gy. wurde das hypothetische Metastasenvolumen auf 6 ml reduziert blieb die berechnete Dosis nahezu gleich.

Zellart	Gewebestruktur [Gleason- Score]	Kumulierte Aktivität in 12 ml [MBq*h]						Kumulierte Aktivität in 6 ml [MBq*h]					
		[¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617			[¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex			[¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617			[¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex		
		0,5 MBq/ml	1 MBq/ml	3 MBq/ml	0,5 MBq/ml	1 MBq/ml	3 MBq/ml	0,5 MBq/ml	1 MBq/ml	3 MBq/ml	0,5 MBq/ml	1 MBq/ml	3 MBq/ml
LNCaP	3	8612	13987	12330	6315	8756	20570	4306	6993	6165	3157	4378	10285
	4	8116	13180	11618	5950	8251	19383	4058	6590	5809	2975	4126	9692
	5	8972	14570	12844	6578	9121	21428	4486	7285	6422	3289	4561	10714
	Mittelwert	8484	13778	12146	6221	8626	20264	4242	6889	6073	3110	4313	10132
CTC	3	13995	22729	20036	10261	14229	33426	6998	11364	10018	5131	7114	16713
	4	13188	21417	18880	9669	13408	31498	6594	10709	9440	4835	6704	15749
	5	14579	23677	20872	10690	14822	34821	7289	11838	10436	5345	7411	17410
	Mittelwert	13787	22390	19737	10109	14017	32928	6893	11195	9869	5054	7008	16464
PC3	3	74	92	330	1623	3361	11254	37	46	165	811	1680	5627
	4	70	87	311	1529	3167	10605	35	43	156	765	1583	5303
	5	77	96	344	1690	3501	11724	38	48	172	845	1750	5862
	Mittelwert	73	91	325	1599	3311	11087	36	45	163	799	1655	5543
CTC	3	138	173	619	3043	6301	21102	69	86	310	1521	3151	10551
	4	130	163	583	2867	5938	19885	65	81	292	1434	2969	9942
	5	144	180	645	3170	6564	21982	72	90	322	1585	3282	10991
	Mittelwert	136	170	610	2997	6207	20787	68	85	305	1499	3104	10394

Tabelle 26: Darstellung der auf Basis der in-vitro-Versuchen berechneten kumulierten Aktivität in einer Metastase mit 12 ml oder 6 ml Volumen in Abhängigkeit der Zellart, der Gewebestruktur und der Inkubationsaktivitäten, CTC: im Blut zirkulierende Tumorzellen; Die Standardabweichung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Sie beträgt im Mittel 25 %

Zellart	Gewebestruktur [Gleason- Score]	Dosis in 12 ml [Gy]						Dosis in 6 ml [Gy]					
		[¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617			[¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex			[¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617			[¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex		
		0,5 MBq/ml	1 MBq/ml	3 MBq/ml	0,5 MBq/ml	1 MBq/ml	3 MBq/ml	0,5 MBq/ml	1 MBq/ml	3 MBq/ml	0,5 MBq/ml	1 MBq/ml	3 MBq/ml
LNCaP	3	57	93	82	42	58	137	57	93	82	42	58	136
	4	54	88	77	40	55	129	54	87	77	39	55	129
	5	60	97	86	44	61	143	60	97	85	44	61	142
	Mittelwert	57	92	81	41	57	135	56	91	81	41	57	134
CTC	3	93	151	133	68	95	223	93	151	133	68	94	222
	4	88	143	126	64	89	210	88	142	125	64	89	209
	5	97	158	193	71	99	232	97	157	138	71	98	231
	Mittelwert	92	149	132	67	93	219	91	149	131	67	93	218
PC3	3	0	1	2	11	22	75	0	0	1	11	22	75
	4	0	1	2	10	21	71	0	0	1	10	21	70
	5	1	1	2	11	23	78	1	0	1	11	23	78
	Mittelwert	0	1	2	11	22	74	0	0	1	11	22	74
CTC	3	1	1	4	20	42	141	1	1	2	20	42	140
	4	1	1	4	19	40	132	1	1	2	19	39	132
	5	1	1	4	21	44	146	1	1	2	21	44	146
	Mittelwert	1	1	4	20	41	138	1	1	2	20	41	138

Tabelle 27: Darstellung der auf Basis der in-vitro-Versuchen berechneten Dosis in einer Metastase mit 12 ml oder 6 ml Volumen in Abhängigkeit der Zellart, der Gewebestruktur und der Inkubationsaktivitäten, CTC: im Blut zirkulierende Tumorzellen; Die Standardabweichung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Sie beträgt im Mittel 25 %

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen in wie weit Dosis-Wirkungsbeziehungen für LNCaP- und PC3-Zellen in in-vitro-Versuchen darstellbar sind und ob diese Erkenntnisse auf Patientenstudien übertragbar sind. Dem voraus gegangen ist die Charakterisierung der Aufnahmekinetik sowie der Bindungsspezifität und der subzellulären Verteilung der Radiopharmaka. Tabelle 28 und 29 zeigen überblicksartig die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit. Mit Hilfe unterschiedlicher zellulärer *S*-Werte konnte die kumulierte zelluläre Aktivität der in-vitro-Versuche in eine zelluläre Dosis überführt werden. Vergleichend wurde mit Hilfe zweier Patientenstudien die kumulierte Aktivität sowie Dosis je einer Knochen- sowie einer Weichteilmetastase berechnet. Basierend auf diesen Ergebnissen sowie unter Zuhilfenahme der Ergebnisse der in-vitro-Versuche konnte die hypothetische kumulierte Aktivität sowie Dosis für eine hypothetische Metastase ähnlich der in den Patientenstudien approximiert werden. Die zelluläre Dosis variierte je nach verwendetem *S*-Wert erheblich. Damit wird deutlich, dass für die Betrachtung einer Dosis-Wirkungsbeziehung die Dosis aufgrund ihrer modellbedingten Fehler nicht zwingend die geeignetste Größe darstellt. Ein Vergleich von kumulierten-Aktivitäts-Wirkungsbeziehungen erscheint hierbei als ein grundsätzlich möglicher Weg, die Einflüsse modellbedingter Unterschiede der *S*-Werte und Schwierigkeiten bei der Überführung gemessener Aktivitätswerte in resultierende Dosiswerte in Untersuchungen basierend auf ein und demselben Nuklid bei ähnlichen geometrischen Situationen - also bspw. innerhalb verschiedener Zellkulturstudien - zu reduzieren.

Die Wirkung der Radiopharmaka konnte mittels Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellpopulation in den Wachstumskurven quantifiziert werden. Ob es sich hierbei um eine Reduktion der Proliferationsrate oder um eine Zellsterben handelt, konnte mit den gewählten Methoden nicht differenziert werden. Die Darstellung eines abweichenden Proliferationsverhaltens mittels [¹⁸F]FLT gelang nicht. Die Zellzyklusanalyse der mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 exponierten LNCaP-Zellen zeigte eine Reduktion der sich in der *S*-Phase befindlichen Zellen, jedoch keine Zunahme der Fraktion apoptotischer Zellen.

Zelllinie	Initiale in-vitro Aktivitätskonzentration [MBq/2 ml]	Kumulierte Aktivität/Zelle (λ) [MBq*h] im Zeitraum 72 h	Zelluläre Dosis (ν) im Zeitraum 72 h [Gy] nach MIRD	Dosis/Zellkern (ν) im Zeitraum 72 h [Gy] nach MIRD	Dosis/Zellkern (ν) im Zeitraum 72 h [Gy] Mesh Struktur	Wirkung 1 (Zellüberleben) (ξ)	Wirkung 2 (^{18}F]FLT) (π)	Wirkung 3 (Zellzyklus) (\omicron)	Hypothetische kumulierte Aktivität (ι) [MBq*h] in Weichteilmetastase (12 ml) im Zeitraum 72 h	Hypothetische Dosis (κ) [Gy] in Weichteilmetastase (12ml) im Zeitraum 72 h	Kumulierte Aktivität in Metastase (ζ) Patientenstudie [MBq*h] im Zeitraum 72 h	Dosis in Metastase (θ) Patientenstudie [Gy] im Zeitraum 72 h	
LNCaP		^{177}Lu]Lu-PSMA-617										8182	55
	0,5	2,0E-06	3,8	2,0	0,5	↓			8484	57			
	1	3,2E-06	6,2	3,2	0,9	↓	↔	*	13778	92			
	3	2,8E-06	5,5	2,8	0,8	↓			12146	81			
		^{177}Lu]Lu-X-Komplex											
	0,5	1,5E-06	3,2	1,3	0,4	↓			6221	41			
	1	2,0E-06	4,5	1,7	0,5	↓	↔		8626	57			
	3	4,7E-06	10,5	4,0	1,3	↓			20264	135			
	PC3		^{177}Lu]Lu-PSMA-617										
0,5		2,0E-08	0,1	0,1	0,0	↔			73	0			
1		2,4E-08	0,1	0,1	0,0	↔	↔	↔	91	1			
3		8,8E-08	0,2	0,1	0,0	↔			325	2			
		^{177}Lu]Lu-X-Komplex											
0,5		4,3E-07	0,1	0,4	0,1	↔			1599	11			
1		8,9E-07	2,0	0,7	0,2	↔	↔		3311	22			
3		3,0E-06	6,7	2,5	0,8	↓			11087	74			

Tabelle 28: Übersicht der Ergebnisse; ↓: verringertes Zellüberleben; ↔: keine Wirkung; *: Veränderung des Zellzyklus nachweisbar; leeres Feld: keine Messung vorhanden; die hypothetische kumulierte Aktivität (ι) und Dosis (κ) ist exemplarische für die Metastasen von **Patient 1** (Weichteilmetastase, Volumen 12 ml, applizierte Aktivität 3592 MBq) dargestellt. Die Standardabweichung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Sie beträgt im Mittel 25 %; die griechischen Buchstaben stellen den Bezug zu Abbildung 6 her

Zelllinie	Initiale in-vitro Aktivitätskonzentration [MBq/2 ml]	Kumulierte Aktivität/Zelle (λ) [MBq*h] im Zeitraum 72 h	Zelluläre Dosis (ν) im Zeitraum 72 h [Gy] nach MIRD	Dosis/Zellkern (ν) im Zeitraum 72 h [Gy] nach MIRD	Dosis/Zellkern (ν) im Zeitraum 72 h [Gy] Mesh Struktur	Wirkung 1 (Zellüberleben) (ξ)	Wirkung 2 ($[^{18}\text{F}]\text{FLT}$) (π)	Wirkung 3 (Zellzyklus) (ρ)	Hypothetische kumulierte Aktivität (ι) [MBq*h] in Knochenmetastase (6 ml) im Zeitraum 72 h	Hypothetische Dosis (κ) [Gy] in Knochenmetastase (6ml) im Zeitraum 72 h	Kumulierte Aktivität in Metastase (ζ) Patientenstudie [MBq*h] im Zeitraum 72 h	Dosis in Metastase (θ) Patientenstudie [Gy] im Zeitraum 72 h
LNCaP		[^{177}Lu]Lu-PSMA-617									7275	97
	0,5	2,0E-06	3,8	2,0	0,5	↓			4242	56		
	1	3,2E-06	6,2	3,2	0,9	↓	↔	*	6889	91		
	3	2,8E-06	5,5	2,8	0,8	↓			6073	81		
		[^{177}Lu]Lu-X-Komplex										
	0,5	1,5E-06	3,2	1,3	0,4	↓			3110	41		
	1	2,0E-06	4,5	1,7	0,5	↓	↔		4314	57		
	3	4,7E-06	10,5	4,0	1,3	↓			10132	134		
	PC3		[^{177}Lu]Lu-PSMA-617									
0,5		2,0E-08	0,1	0,1	0,0	↔			36	0		
1		2,4E-08	0,1	0,1	0,0	↔	↔	↔	45	0		
3		8,8E-08	0,2	0,1	0,0	↔			163	1		
		[^{177}Lu]Lu-X-Komplex										
0,5		4,3E-07	0,1	0,4	0,1	↔			799	11		
1		8,9E-07	2,0	0,7	0,2	↔	↔		1655	22		
3	3,0E-06	6,7	2,5	0,8	↓			5543	74			

Tabelle 29: Übersicht der Ergebnisse; ↓: verringertes Zellüberleben; ↔: keine Wirkung; *: Veränderung des Zellzyklus nachweisbar; leeres Feld: keine Messung vorhanden; die hypothetische kumulierte Aktivität (ι) und Dosis (κ) ist exemplarische für die Metastasen von **Patient 2** (Knochenmetastase, Volumen 6 ml, applizierte Aktivität 6063 MBq) dargestellt. Die Standardabweichung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Sie beträgt im Mittel 25 %; die griechischen Buchstaben stellen den Bezug zu Abbildung 6 her

6.1 Aufnahmekinetik, Bindungsspezifität und subzelluläre Verteilung der Radiopharmaka

Die Ergebnisse der Versuche zur Charakterisierung der Aufnahmekinetik, der Bindungsspezifität sowie der subzellulären Verteilung der Radiopharmaka bildeten die experimentelle Grundlage der Dosisberechnungen.

Die Versuche zur Aufnahmekinetik zeigten eine vom Radiopharmakon sowie eine zum Teil von der Aktivitätskonzentration abhängige Aufnahmekinetik der LNCaP- und PC3-Zellen. Innerhalb der ersten 30 min zeigte sich in allen Gruppen ein steiler Anstieg der zellulären Zählrate, welcher nach 2 h sein Maximum erreichte. Liu et al. zeigten, dass 5 Minuten nach Inkubationsbeginn der LNCaP-Zellen mit dem Liganden J591 die Mehrheit der Liganden im Bereich der Zellmembran lokalisiert waren. Nach 20 Minuten Inkubationszeit konnte J591 in intrazellulären Vesikeln nachgewiesen werden. Zum Versuchszeitpunkt 180 Minuten war die Mehrheit der Liganden in der Nähe des Zellkerns lokalisiert sowie vereinzelt im Zytoplasma verteilt (Liu et al., 1998). Somit ist der steile Anstieg der zellulär gebundenen Aktivität als Bindung von [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 an die PSMA-Rezeptoren der Zelloberfläche sowie als die beginnende Internalisierung des Radiopharmakons zu interpretieren. In den folgenden 4 Stunden bildeten die gemessenen zellulären Zählraten ein Plateau. Die Ergebnisse in Abschnitt 5.4 zeigen, dass bei gleichbleibender Menge zellulär gebundener Aktivität der zytoplasmatische Anteil konstant zunimmt. Um eine Plateaubildung der zellulär gebundenen Aktivität unter Zunahme der zytoplasmatischen Aktivität über mehrere Stunden zu erreichen, könnte eine Abnahme der membrangebundenen Aktivität oder eine Externalisierung des Radiopharmakons ursächlich gewesen sein.

Eine Verdoppelung der Aktivitätskonzentration von 0,5 MBq/2 ml auf 1 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 führte über den gesamten Versuchszeitraum von 48 h zu einer Verdoppelung der zellulär gebundenen Aktivitätsmenge der LNCaP-Zellen (Abbildung 10, Abbildung 11). Zum Versuchszeitpunkt 24 h und 48 h war die zellulär gebundene Aktivitätsmenge bei Exposition mit 3 MBq/2 ml nahezu identisch mit der bei Exposition mit 1 MBq/2 ml. Hieraus lässt sich schließen, dass die PSMA-Rezeptoren der LNCaP-Zellen bei einer angebotenen Aktivitätskonzentration von 1 MBq/2 ml in dem gewählten Versuchstyp gesättigt waren. Eine Zunahme der zellulär gebundenen Aktivität war trotz Steigerung der Aktivitätskonzentration im umliegenden Medium nicht mehr möglich. Der Anteil der zytoplasmatischen Fraktion bei Inkubation der LNCaP-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 ist von der Temperatur abhängig. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 lag die zytoplasmatische

Fraktion um 53 % über jener der bei 4 °C inkubierten Zellen. Da die Endozytose bei Temperaturen <12 °C gehemmt ist, bestätigt dies, dass die Internalisierung von [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 über Endozytose vermittelt wurde. Weineisen et al. konnten hingegen zwischen 10 min und 60 min Inkubationszeit keine weitere prozentuale Zunahme der zytoplasmatischen Fraktion bei Inkubation der LNCaP-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA I&T beobachten (Weineisen et al., 2015). Dies könnte ein Beleg dafür sein, dass die Kinetik der Aufnahme von PSMA I&T und PSMA-617 nicht vergleichbar ist.

Bei Inkubation der LNCaP-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex zeigte sich abweichend zur Inkubation mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 ein Anstieg der zellulären Zählrate durch Erhöhung der Aktivitätskonzentration von 1 MBq/2 ml auf 3 MBq/2 ml (Abbildung 12). Es konnte somit bei Exposition mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex keine Sättigung der zellulär gebundenen Aktivität erreicht werden. Die Bindung und Internalisierung des Radiopharmakons in die LNCaP-Zellen scheint bei einer Aktivitätskonzentration von bis zu 1 MBq/2 ml über den PSMA-Rezeptor effektiver als über den Mechanismus der Internalisierung des [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex zu verlaufen. Zudem scheint der Mechanismus der Bindung und Internalisierung des [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex im Gegensatz zum PSMA-Rezeptor keiner Sättigung zu unterliegen. Der zytoplasmatische Anteil des zellulär gebundenen [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex stieg bei Inkubation der LNCaP-Zellen mit zunehmender Dauer der Inkubation an, lag jedoch bei gleicher Inkubationszeit unterhalb jenem der mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 exponierten Zellen. Die langsamere Zunahme der zytoplasmatischen Fraktion des [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex lässt auf einen anderen Mechanismus der Internalisierung im Vergleich zu [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 schließen.

Bei Exposition der PC3-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 war eine geringe spezifische zelluläre Bindung der Aktivität zu beobachten. Da die zellulären Zählraten maximal dem doppelten der Leerwerte entsprachen, ist die Validität fraglich. Ein geringer unspezifischer Uptake wäre zudem denkbar. Welcher Mechanismus der zellulären Bindung und Aufnahme von [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 in die PC3-Zellen zugrunde liegt ist unklar, da PC3-Zellen keine PSMA-Rezeptoren an ihrer Oberfläche exprimieren (Gorges et al., 2016). Die zellulären Zählraten der PC3-Zellen bei Exposition mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex lagen circa zwei Größenordnungen über jenen, welche mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 exponiert wurden und sind somit in der Größenordnung mit der [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617-Aufnahme durch LNCaP-Zellen vergleichbar. Auch bei Exposition der PC3-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex bewirkte eine Verlängerung der Inkubationszeit eine Erhöhung der zytoplasmatischen Fraktion. Die Versuche zur Untersuchung der Bindungsspezifität des [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplexes an die PC3-Zellen

zeigten signifikant niedrigere Leerwerte als in den Aufnahmeversuchen, sodass von einer geringen signifikanten Bindung und Aufnahme des [^{177}Lu]Lu-X-Komplex in die PC3-Zellen ausgegangen werden kann.

Beide Zelllinien zeigten keine Sättigung des Mechanismus der Bindung und Internalisierung des [^{177}Lu]Lu-X-Komplex. Durch Reduktion der Temperatur bei Inkubation der LNCaP- und PC3-Zellen konnte eine Verringerung des zytoplasmatischen Anteils der zellulär gebundenen Aktivität auf die Hälfte beobachtet werden. Daher ist eine Internalisierung des [^{177}Lu]Lu-X-Komplex via Endozytose wahrscheinlich. Möglich wäre eine Caveolae-vermittelte Endozytose, da diese langsamer abläuft als die Clathrin-Vermittelte Endozytose (Oh et al., 2012).

6.2 Dosis-Wirkungs-Beziehungen

6.2.1 Zellüberleben

Die Exposition der LNCaP-Zellen mit [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 bewirkte zum Versuchszeitpunkt 24 h und 48 h eine von der Aktivitätskonzentration abhängige, jedoch von der resultierenden Dosis unabhängige Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 6 ξ). Eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit, welche sich als Stagnation der Zellzahl in den Wachstumskurven abbildet, kann sich entweder aus einem Absterben weniger Zellen bei gleichzeitiger Proliferation der übrigen Zellen oder aus einem Proliferationsrückgang aller Zellen einer Population ergeben. Bereits bei einer zellulären Dosis von 3,8 Gy konnte zum Versuchszeitpunkt 48 h ein verringertes Überleben der LNCaP-Zellen beobachtet werden. Im Rahmen dieses Versuchdesigns konnte somit kein Dosiswellenwert ermittelt werden. Eine Steigerung der zellulären Dosis auf 6,2 Gy bewirkte keine weitere Abnahme des Zellüberlebens. Hingegen wurde bei Exposition mit 5,5 Gy, welche durch Inkubation mit 3 MBq/2 ml [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 entstand, eine weitere Reduktion des Zellüberlebens beobachtet.

Bei Inkubation der LNCaP-Zellen mit dem [^{177}Lu]Lu-X-Komplex konnte ein Zusammenhang zwischen der Aktivitätskonzentration bzw. der applizierten Dosis und der Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit festgestellt werden. Vergleicht man die Wirkung der beiden Radiopharmaka auf das Zellüberleben so zeigt sich, dass eine Steigerung der Dosis des [^{177}Lu]Lu-X-Komplex auf 10,5 Gy einen ähnlichen Effekt auf das Zellüberleben hatte wie 5,5 Gy [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. Es wurde somit gezeigt, dass eine Dosis oberhalb von 5,5 Gy in diesem Versuchdesign nicht zu einer weiteren Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit in LNCaP-Zellen führt.

Die in Abbildung 21 dargestellten Ergebnisse zeigen keinen Einfluss der Exposition mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 auf das Wachstumsverhalten der PC3-Zellen. Die in Abschnitt 5.6 berechnete Dosis von circa 0,1 Gy, welche durch Exposition der PC3-Zellen mit unterschiedlichen Aktivitätskonzentrationen [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 resultierte, war folglich nicht ausreichend, um einen Einfluss auf das Wachstum der PC3-Zellen zu erzielen. Eine Dosis von 6,7 Gy durch Exposition der PC3-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex führte hingegen zu einer Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit der PC3-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 6 ξ). Dieser Effekt ist vergleichbar mit der für LNCaP-Zellen beobachteten Wirkung. Somit ist im Rahmen dieser Arbeit festzustellen, dass eine obere Grenze des Dosiswellenwerts für das zelluläre Überleben von PC3-Zellen bei 6,7 Gy liegt. Dies korrespondiert mit einer Zellkerndosis von 2,5 Gy.

Die Daten aus Tabelle 28 und Tabelle 29 legen nahe, dass LNCaP-Zellen in den Versuchen dieser Arbeit bei einer RLT mit [¹⁷⁷Lu]Lutetium strahlensensibler waren als die PC3-Zellen, da eine Wachstumshemmung bereits bei 3,8 Gy gegenüber 6,7 Gy beobachtet wurde. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen der Autoren Jossen et al. und van Oorschot et al., welche durch Koloniebildungstests die unterschiedliche Radiosensitivität beider Zelllinien zeigten (Jossen et al., 2006, van et al., 2013). Jossen et al. postulieren hohe Spiegel des Proteins RelB und des antioxidativen Enzyms MnSOD (Manganese superoxide dismutase) im Zellkern als mitverantwortlich für eine intrinsische Strahlenresistenz der PC3-Zellen (Jossen et al., 2006).

Doch bei genauerer Durchsicht der Daten der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass für PC3-Zellen keine Aussage im Bereich zwischen 0,1 Gy und 6,7 Gy getroffen werden kann. Ob sich bei Exposition der PC3-Zellen eine mit den LNCaP-Zellen vergleichbare Wirkung im Zellüberleben nach einer [¹⁷⁷Lu]Lutetium basierten RLT zeigen würden, kann mit den vorliegenden Daten nicht bewertet werden. Anders als in den Versuchen von Jossen et al., welche mit einer Teletherapie ähnlichen Bestrahlung die erreichten Dosen nach Belieben einstellen können u.a. auch, weil ein mikroskopisch homogenes Strahlenfeld vorliegt, ist dies bei in-vitro-Versuchen zur RLT aufgrund der Kinetik des zellulären Uptakes sowie einer auch mikroskopisch vorliegendem heterogenen Strahlenfeld kaum möglich. Hierzu würden weiter ausdifferenzierte umfangreiche Untersuchungen in verschiedenen Versuchsaufbauten benötigt werden, in denen die Gesamtkubationsdauer sowie die Aktivitätskonzentration im Zellkulturmedium variiert werden.

6.2.2 Proliferationsverhalten

Da [^{18}F]FLT vermehrt in stoffwechselaktiven Zellen aufgenommen wird, kann hiermit die Zellproliferation dargestellt werden (Janet S. Rasey et al., 2002). Das in die Zellen aufgenommene [^{18}F]FLT wird durch die Thymidine Kinase 1 (TK1) phosphoryliert und kann somit die Zelle nicht mehr verlassen. Die intrazellulären Anreicherung von [^{18}F]FLT korreliert daher mit der TK1-Aktivität, welche zu Beginn der S-Phase um etwa das 10-fache zu nimmt. Ein Einbau in die DNA oder Abbau durch den Zellstoffwechsel finden nicht statt (Nobuyuki Oyama et al., 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden LNCaP- und PC3-Zellen mit [^{18}F]FLT inkubiert, um einen Einfluss der Bestrahlung mit [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 oder dem [^{177}Lu]Lu-X-Komplex auf die Zellproliferation zu evaluieren. Es zeigte sich, dass weder eine Inkubation der Zellen mit [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 noch mit dem [^{177}Lu]Lu-X-Komplex eine signifikante Veränderung der [^{18}F]FLT-Aufnahme 48 h nach Bestrahlungsende im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkte (Abbildung 6 π). Es wurde somit gezeigt, dass eine Wirkung der Bestrahlung mit [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 oder dem [^{177}Lu]Lu-X-Komplex 72 h nach Bestrahlungsbeginn nicht mehr mittels [^{18}F]FLT nachweisbar ist. Auffallend war die signifikante höhere [^{18}F]FLT-Aufnahme der PC3-Zellen im Vergleich zu den LNCaP-Zellen, welche mit einer höheren Proliferationsrate, wie sie auch in den nativen Zellwachstumskurven zum Ausdruck kommt, übereinstimmt. Die unveränderte [^{18}F]FLT-Aufnahme in die bestrahlten Zellen steht im Widerspruch zur Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit nach Bestrahlung, sowie zur Veränderung des Zellzyklus der LNCaP-Zellen nach Bestrahlung mit [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 bei gleichzeitig fehlendem apoptotischen Nachweis. Eine mögliche Ursache für die fehlende Differenz des [^{18}F]FLT-Uptakes beider Gruppen könnten die Kulturbedingungen der Zellen zum Zeitpunkt der Inkubation mit [^{18}F]FLT darstellen. Zum Zeitpunkt der Exposition mit [^{18}F]FLT waren die Zellen bereits 6 Tage auf der Zellkulturschale gewachsen und zwei Zellkulturmediumwechseln unterzogen worden. Die Zellen befanden sich somit in der stationären Phase. Janet et al. beschrieben den Zusammenhang zwischen Zellkulturbedingungen und dem [^{18}F]FLT-Uptake in Bronchial-Karzinom-Zellen. Sie beobachteten einen signifikant geringeren [^{18}F]FLT-Uptake bei Wachstum der Zellen über 8 Tage in derselben Zellkulturschale. Ein Mediumwechsel fand nicht statt. Nach Ernten und Aussaat dieser Zellen stieg der [^{18}F]FLT-Uptake nach 24 h auf das Vierfache an (Janet S. Rasey et al., 2002). Ein möglicherweise zu groß gewählter Abstand zwischen Beginn der 24-stündigen Bestrahlung mit [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 oder dem [^{177}Lu]Lu-X-Komplex und der Inkubation mit [^{18}F]FLT von 72 h, wäre zudem denkbar. Janet et al. sahen

bis 28 h nach Bestrahlung mit [¹³⁷Cs]Caesium einen verringerten [¹⁸F]FLT-Uptake (Janet S. Rasey et al., 2002).

6.2.3 Zellzyklusveränderungen nach Bestrahlung

Um die Wirkung der Bestrahlung genauer zu charakterisieren, wurden mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 exponierten LNCaP- und PC3-Zellen einer Zellzyklusanalyse unterzogen (Abbildung 23 Abbildung 45). Überraschenderweise zeigte sich weder bei den LNCaP- noch bei den PC3-Zellen eine signifikante Zu- oder Abnahme der Sub-G1-Fraktion, welche die apoptotischen Zellen beschreibt (Abbildung 6 o). Eine mögliche Ursache könnte ein geringerer Anteil an apoptotischen Zellen in den bestrahlten Zellproben im Vergleich zur Positivkontrolle mit Staurosporin sein. Reduziert sich dieser weiter, beispielsweise durch wiederholte Wasch- und Zentrifugationsschritte während der Probenaufarbeitung, sinkt der Anteil an apoptotischen Zellen unter die Nachweisgrenze. Denkbar wäre zudem, dass der Zeitpunkt der Aufarbeitung mit 48 h nicht optimal gewählt war, um apoptotische Zellen mittels Durchflusszytometrie nachzuweisen (Ortiz-ferron, 9. Juli 2016).

Die Verteilung der Zellzyklusphasen der PC3-Zellen blieb von der Bestrahlung unbeeinflusst. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Wachstumskurven nach Exposition mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617, welche ebenfalls keinen Effekt der Bestrahlung auf das Zellwachstum zeigen, sowie mit der unveränderten [¹⁸F]FLT-Aufnahme nach Exposition mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617. Die durch die Bestrahlung mit 1 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 erreichte Dosis von 0,1 Gy reichte somit nicht aus um einen Effekt auf die PC3-Zellen zu erzielen. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Ergebnissen von Saga et. al. (Saga et al., 2019).

Bei Exposition der LNCaP-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 wurde hingegen eine diskrete Zunahme an Zellen, welche sich in der G1- und G2-Phase befinden, sowie eine Verringerung der Anzahl der Zellen in der S-Phase, beobachtet. Eine mögliche Erklärung für den diskreten Anstieg der Zellen in der G1-Phase ist, dass die Apoptose vor allem in der G2/M oder S-Phase stattfindet. Somit finden sich die apoptotischen Zellen teilweise in der G1-Phase wieder (Ortiz-ferron, 9. Juli 2016). Dies führt zu einem Anstieg der Zellen in der G1-phase jedoch ohne Anstieg der Sub-G1-Fraktion. Der diskrete Anstieg der sich in der G2-Phase befindenden LNCaP-Zellen könnte auf einen Arrest der Zellen in der G2-Phase in Folge der Bestrahlung mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 zurückzuführen sein (Ochab-Marcinek et al., 2009). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Wachstumskurven, welche eine reduzierte

Wachstumsgeschwindigkeit der LNCaP-Zellen nach Bestrahlung mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 zeigen. Widersprüchlich ist jedoch die unveränderte Aufnahme von [¹⁸F]FLT in die LNCaP-Zellen nach Bestrahlung.

Untersuchungen an PC3-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 führten zu einer geringeren – vermutliche unspezifischen Aufnahme – mit einer gegenüber den LNCaP-Zellen um den Faktor 10-15 reduzierten Dosisdeposition. Cross dose-Beiträge waren gegenüber dem unspezifischen Uptake signifikant reduziert. Der resultierende Netto-Dosis-Gesamtbeitrag führte lediglich beim Zellüberleben nach Exposition mit 3 MBq/2 ml zu einer nachweisbaren Wirkung.

6.3 Übertragbarkeit auf makroskopische Situation

Um den Vergleich der Ergebnisse der Patientenstudien mit den Ergebnissen der in-vitro-Studien zu ermöglichen, wurde ein möglichst nahe an der in-vivo-Situation gelegenes Versuchssetup gewählt. Die in den Patientenstudien applizierte Aktivität lag zwischen 4,6 GBq und 6,0 GBq [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617, welches einer Aktivitätskonzentration von 1 MBq/ml im Blutpool entspricht. Für die Zellversuche wurden entsprechend Aktivitätskonzentrationen im Zellkulturmedium von 0,5 MBq/2 ml bis maximal 3 MBq/2 ml gewählt. Die Patientenstudien zeigten ein verzögertes Abfluten des Radiopharmakons in der Knochenmetastase von Patient 2 im Vergleich zu Weichteilmetastase von Patient 1 (Abbildung 26). Peters et al. konnten hingegen keinen Unterschied in der Kinetik der Aufnahme von [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 zwischen Knochen- und Lymphknotenmetastasen feststellen (Peters et al., 2021). Ob es sich bei der beobachteten unterschiedlichen Aufnahmekinetik zwischen der Weichteil- und der Knochenmetastase um eine statistisch signifikant abweichende Kinetik handelt, ist mit Blick auf den exemplarischen Charakter der Untersuchung nicht zu beantworten. Die in der Zellkultur beobachtete Aufnahmekinetik bildet am nächsten die Situation in der Weichteilmetastase von Patient 1 ab, da das Maximum der Aktivitätskonzentration – und somit vergleichbare kumulierte Aktivitäten – sowohl in der Zellkultur, als auch bei der Weichteilmetastase zum Messzeitpunkt 24 h beobachtet werden konnte.

Tabelle 28 und Tabelle 29 fassen überblicksartig die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen. Sie zeigen, dass die zelluläre Dosis etwa um den Faktor 15 unterhalb der aus den zellulären Daten ermittelten Dosis einer Metastase lag (Abbildung 6 κ, Tabelle 28 und Tabelle 29). So führte die Inkubation von LNCaP-Zellen mit 1 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 in der Zellkultur zu einer zellulären Dosis von 6,2 Gy. Eine Metastase mit einem Volumen von 6 ml hat entsprechend

der in Kapitel 4.2.12 gezeigten Prozedur circa 2×10^9 Zellen. Somit ergibt sich bei einer Skalierung des zellulären Uptakes, welcher zu einer Dosis vom 91 Gy auf die hypothetische Metastase führt, eine kumulierte Aktivität von 6889 MBq*h. Ein Vergleich dieser mit der für Patient 2 ermittelten kumulierten Aktivität von 7275 MBq*h zeigt, dass das gewählte Versuchsdesign durchaus geeignet ist, um mikroskopisch vergleichbare kumulierte Aktivitäten gegenüber den Patientenstudien zu erzielen. Diese Übereinstimmung lässt sich auch für verschiedene Setups mit dem [^{177}Lu]Lu-X-Komplex feststellen – und das sogar für PC-3-Zellen (Tabelle 28 Tabelle 29). Die in diesem Setup errechneten Dosen von 57 Gy und 91 Gy zeigen eine gute Übereinstimmung mit der Dosis in den Patientenstudien (55 Gy und 97 Gy). Trotz ähnlicher kumulierter Aktivitäten in beiden Metastasen war die Dosis in der Metastase von Patient 1 signifikant geringer als in der Metastase von Patient 2.

Obgleich sich ein hohes Maß an Übereinstimmung auf dem Niveau der kumulierten Aktivität zwischen der mikroskopischen (Abbildung 6 ι) und der makroskopischen (Abbildung 6 ζ) Situation erreichen lässt, unterscheiden sich die dabei erreichten Dosen (Abbildung 6 ν, θ) erheblich. Ursächlich dafür ist unter anderem die mittlere Reichweite der β -Strahlung des [^{177}Lu]Lutetium von 0,3 mm. In einem makroskopischen Zielvolumen wie die Metastasen in den Patientenstudien mit beispielweise einem Durchmesser von 2 cm, werden etwa 80 % der im Zielvolumen deponierten Energie auch dort absorbiert. Wird nun die einzelne Zelle mit beispielsweise 14 μm Durchmesser als Zielvolumen betrachtet, werden hingegen nur 2,5 % der im Zielvolumen deponierten Energie auch dort absorbiert. Dies entspricht einem um den Faktor 32 geringeren Energieabsorption im Zielvolumen. Wird der Zelldurchmesser entsprechend dem von Park et al. beschriebenen mittleren Durchmesser aller Tumorzellen der auf 8 μm reduziert, wird folglich eine um den Faktor 47 reduzierte Energiemenge im Vergleich zur makroskopischen Metastase zellulär deponiert. Die *cross dose* Beiträge fielen bei der Betrachtung der zellulären Dosis gering aus. In der makroskopischen Situation tragen diese jedoch, aufgrund der mittleren Reichweite der β -Strahlung, zu einem hohen Maße zur Gesamtdosis bei. Dies bedeutet, dass die Patientensituation zwar auf dem Level der Aktivität sogar in der Zellkultur nachgestellt werden kann, die dabei deponierte Energie jedoch nicht dieselbe ist.

Die Ergebnisse der Arbeit demonstrieren, dass bei einer Inkubation von LNCaP-Zellen mit 3 MBq/2 ml [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 bereits eine Sättigung der zellulären Aufnahme erreicht ist. Eine weitere Steigerung der in-vitro erreichten kumulierten Aktivität, um eine

Übereinstimmung zwischen mikroskopisch und makroskopisch erreichten Dosen zu erzielen, erscheint somit nicht möglich.

Zu berücksichtigen ist jedoch noch die Zusammensetzung der Metastase, welche aus einer Vielzahl verschiedener Zellarten besteht. Dazu gehören neben den PSMA-exprimierenden Epithelzellen auch nicht PSMA-exprimierende Zellen wie Fibroblasten, Muskelzellen und Makrophagen sowie Blutgefäße (Tuxhorn, Ayala und Rowley, 2001). Die vorgenommenen Berechnungen der kumuliertem Aktivität erfolgten jedoch unter der Annahme einer homogen aus Epithelzellen bestehenden Sphäre. Zudem wurde die inhomogenen Verteilung des Radionuklids innerhalb der Metastase nicht berücksichtigt (Tamborino et al., 2020). Eine mögliche Speicherfunktion von anderen Geweben zwischen der Aktivität im Blutpool und der Zielzelle ist unbekannt.

Tabelle 27 in Abschnitt 5.8 zeigt die hypothetische Dosis in einer Metastase mit 12 ml oder 6 ml Volumen (Abbildung 6 θ) unter Annahme der zellulär ermittelten kumulativen Aktivitäten (Abbildung 6 ζ). Je nach Zelllinie, Radiopharmakon, Aktivitätskonzentration sowie *S*-Wertmodell ergab sich eine Dosis zwischen 0 Gy und 232 Gy. Ursächlich für diese große Spannweite ist vor allem die gewählte Zellspezies – also die Präsenz von PSMA-Rezeptoren – und damit begleitend das Ausmaß der Internalisierung des Radiopharmakons. Aufgrund der signifikant geringeren Aktivitätskonzentration im Zellkulturmedium im Vergleich zu intrazellulär fielen die Dosisbeiträge aus dem Medium vernachlässigbar gering aus.

Die in-vitro-Versuche dieser Arbeit zeigen, dass die in dem gewählten Setup erzielten kumulierten Aktivitäten an [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 in den LNCaP-Zellen mit 8484 MBq*h und 6889 MBq*h in guter Übereinstimmung zu den Patientendaten (8182 MBq*h und 7275 MBq*h) stehen. Folglich stellt ein Setup aus 0,5 MBq/ 2 ml (Patient 1) und 1 MBq/ 2 ml (Patient 2) mit einer 24 stündigen Inkubationszeit die Patientensituation gut nach. Die in diesem Setup errechnete Dosis von 57 Gy und 91 Gy zeigen eine gute Übereinstimmung mit der Dosis in den Patientenstudien (55 Gy und 97 Gy). Trotz ähnlicher kumulierter Aktivitäten in beiden Metastasen war die Dosis in der Metastase von Patient 1 signifikant geringer als in der Metastase von Patient 2.

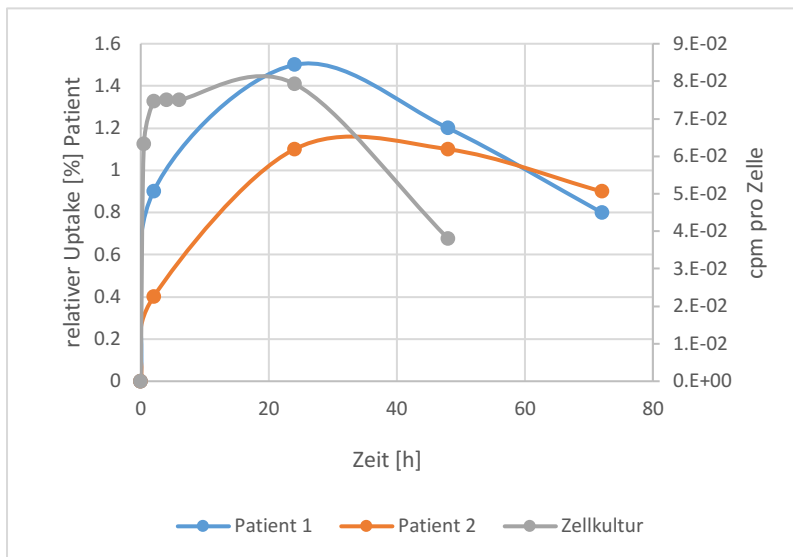


Abbildung 26: Kinetik des relativen Uptakes der Metastase von Patient 1 und 2 sowie des Uptakes/Zelle bei Exposition der LNCaP-Zellen mit 1 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 in der Zellkultur

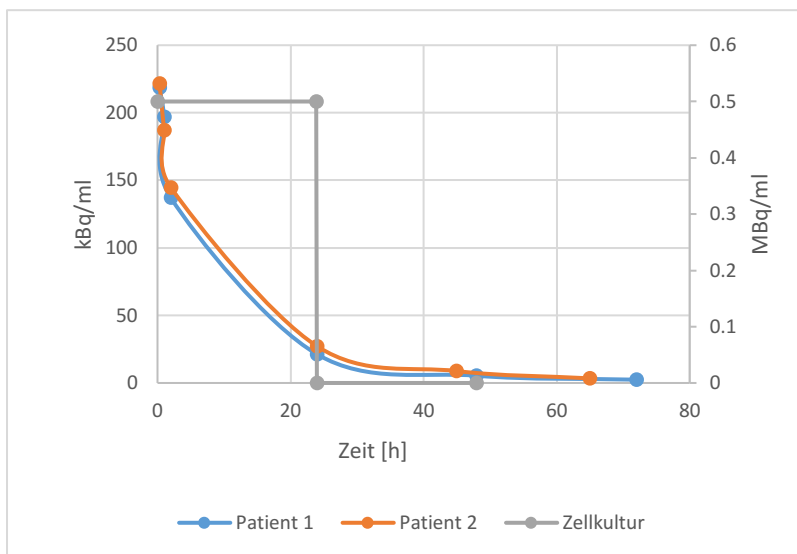


Abbildung 27: Blutpoolaktivität von Patient 1 und 2 Aktivitätskonzentration im Zellkulturmedium

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen in wie weit Dosis-Wirkungsbeziehungen für LNCaP- und PC3-Zellen in in-vitro-Versuchen darstellbar sind und in wie fern diese Erkenntnisse auf Patientenstudien übertragbar sind.

Die Untersuchungen zur Aufnahmekinetik der beiden Radiopharmaka zeigten eine signifikante von der Temperatur und Aktivitätskonzentration abhängige Bindung sowie Aufnahme von [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 oder dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex in die LNCaP-Zellen. Aufgrund der langsameren Internalisierungsgeschwindigkeit und des fehlenden Nachweis einer Sättigung der Aufnahmekinetik des [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplexes ist von zwei unterschiedlichen Mechanismen der Internalisierung der beiden Radiopharmaka auszugehen. In wie fern diese Unterschiede einen Einfluss auf das Ziel dieser Arbeit, die Untersuchung von Dosis-Wirkungsbeziehungen, haben, ist offen. Gegebenenfalls könnte in zukünftigen Untersuchungen gezeigt werden, dass in-vitro-Untersuchungen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex ebenso geeignet sind wie Untersuchungen mit dem Ziel-Radiopharmakon.

Nach Exposition von Zellen der PC3-Zelllinie mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 war lediglich eine minimale unspezifische zelluläre Bindung und Aufnahme zu beobachten. Dies steht im Einklang mit der fehlende PSMA-Expression der PC3-Zellen. Die Bindung und Aufnahme des [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplexes in die PC3-Zellen zeigte wie bei den LNCaP-Zellen eine Abhängigkeit von der Temperatur und Aktivitätskonzentration, bei gleichzeitig fehlendem Nachweis einer Sättigung der Aufnahme. Somit eignet sich der [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex insbesondere, um die Wirkung ionisierender Strahlung aus [¹⁷⁷Lu]Lutetium an PC3-Zellen zu untersuchen.

Die Berechnung der Dosis für eine Zelle bzw. deren Zellkern aus den in-vitro-Versuchen erfolgte auf der Grundlage unterschiedlicher zellulärer *S*-Werte. Die höchste Dosis für die gesamte Zelle (10,5 Gy) wurde bei Exposition der LNCaP-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex erreicht, gefolgt von den mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 exponierten LNCaP-Zellen (6,2 Gy) und den mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex exponierten PC3-Zellen (6,7 Gy). In diesem speziellen Setting war der Dosisbeitrag durch das umgebende Zellkulturmedium aufgrund des hohen Aktivitätskonzentrationsgradienten zwischen intra- und extrazellulär vernachlässigbar gering. Es konnte zudem gezeigt werden, dass sich je nach Wahl der Zellform und des *S*-Wert-Modells eine große Spanne an Dosis hinter der kumulierten Aktivität verbergen könnte.

Die Wirkung beider Radiopharmaka wurde anhand von Wachstumskurven, durchflusszytometrischer Bestimmungen des Zellzyklus, sowie durch Evaluation der [¹⁸F]FLT-Aufnahme charakterisiert. Die mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 exponierten LNCaP-Zellen zeigten eine von der Aktivitätskonzentration, jedoch nicht von der Dosis abhängige Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit, sowie eine durch die Bestrahlung induzierte Zunahme der Zellen in der G1- und G2-Phase bei gleichzeitiger Abnahme der Zellen in der S-Phase. Die mittels [¹⁸F]FLT bestimmte Zellvitalität nach Exposition mit den Radiopharmaka blieb jedoch unverändert. Die Wachstumsgeschwindigkeit der mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex exponierten LNCaP-Zellen zeigte sich sowohl von der Aktivitätskonzentration als auch von der Dosis abhängig, bei gleichzeitig unveränderter [¹⁸F]FLT-Aufnahme. Bei Exposition der PC3-Zellen mit den Radiopharmaka war lediglich bei einer Dosis von 10,5 Gy durch Exposition mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit um den Faktor 0,3 zu beobachten. Somit konnte für diese Zelllinie ein zellulärer Dosis-schwellwert ermittelt werden, bei dem ein Effekt der Bestrahlung nachweisbar ist. Für die übrigen Kombinationen aus Zelllinie und Radiopharmakon konnte hingegen kein unterer Dosis-schwellwert ermittelt werden.

Die durch die Zellversuche gewonnen Erkenntnisse über die Internalisierungskinetik und die subzelluläre Verteilung der Radiopharmaka sowie die histologischen Maßzahlen zur Zellgröße und -dichte bildeten die Grundlage des in dieser Arbeit entwickelten Modells zur Näherung der kumulierten Aktivität sowie Dosis einer in-vivo-Metastase. Die berechnete zelluläre Dosis lag jedoch aufgrund einer geringeren Energieabsorption der durch die Radiopharmaka deponierten Energie auf zellulärer Ebene unterhalb der Dosis der in-vivo-Versuche. Die in-vitro-Versuche dieser Arbeit zeigen, dass die in dem gewählten Setup erzielten kumulierten Aktivitäten an [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 in den LNCaP-Zellen mit 8484 MBq*h und 6889 MBq*h in guter Übereinstimmung zu den Patientendaten (8182 MBq*h und 7275 MBq*h) stehen. Somit bildet ein Setup aus 0,5 MBq/ 2 ml (Vgl. Patient 1) und 1 MBq/ 2 ml (Vgl. Patient 2) mit einer 24 stündigen Inkubationszeit die Patientensituation gut ab. Die in diesem Setup erreichten zellulären Dosen von 3,8 Gy und 6,2 Gy zeigten hingegen keine gute Übereinstimmung mit den in den Patientenstudien erreichten Dosen von 55 Gy und 97 Gy.

8 Ausblick

Aufgrund der zunehmenden Verbreitung der Radioligandentherapie in der Behandlung des metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinoms ist eine möglichst genaue und patientenspezifische Dosimetrie notwendig. Sie soll unter anderem schwerwiegende Nebenwirkungen der Therapie verhindern und eine möglichst hohe Effektivität der Therapie ermöglichen.

Der Bedarf, eine Dosis-Wirkungsbeziehung in vitro-basiert zu untersuchen, wird somit auch zukünftig bestehen, da nur so induzierte molekularbiologische Wirkungen mit der applizierten Dosis korreliert werden können. Um eine Übereinstimmung der makroskopisch und mikroskopisch erzielten Dosen zu erreichen, sind verschiedene Ansätze denkbar:

- (1) Die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche werden in einer 3D-Zellkultur oder in einem in-ovo-Modell durchgeführt, wobei die mittlere Reichweite der β -Strahlen von 3 mm auch hier die Herausforderung der Erzeugung geeigneter Modelle birgt.
- (2) Die Aktivitätskonzentration des Überstandes im Zellkulturmedium wird bedarfsangepasst erhöht, so dass die cross dose-Beiträge die fehlenden Dosisbeiträge ergänzen. Wenn es zudem gelingt, die Zellen auf einer Membran in einem Medium derart anwachsen zu lassen, dass sie allseitig bestrahlt werden, würde dies der makroskopischen Situation am nächsten kommen. Allerdings sind die dafür benötigten Aktivitätskonzentrationen etwa 1000-fach höher als in den Versuchsaufbauten dieser Arbeit, was gleichermaßen zu einem Verfügbarkeits- sowie zu einem Strahlenschutzproblem führt.
- (3) Die Verwendung des $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X}$ -Komplex erlaubt eine weitaus höhere Dosisdeposition in den LNCaP-Zellen als es mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA}$ möglich ist. Nachfolgende Untersuchungen könnten mit dem $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X}$ -Komplex bei erheblich höheren Aktivitätskonzentrationen durchgeführt werden, mit dem Ziel, vordergründig um die self dose-Beiträge zu erhöhen. Dabei wird eine Erhöhung der Aktivitätskonzentration um den Faktor 10-20 als möglicherweise zielführend vermutet.

Um klinisch eine möglichst hohe Dosisdeposition im Zielgewebe unter Schonung des Normalgewebes zu erreichen, wird in der Strahlentherapie das Konzept der Dosisfraktionierung angewandt. Dieses ermöglicht eine Applikation von hohen Dosen, die bei einmaliger Gabe schwerwiegenden Nebenwirkungen hervorrufen würden. In der RLT wird dieses Konzept mit einer weniger feinschrittigen Fraktionierung angewandt. Einzelne Studien widmen sich jedoch

bereits der Umsetzung dieses Themas in Zusammenhang mit dem Einsatz [¹⁷⁷Lu]Lutetium-markierter Radiopharmaka bei Patienten mit metastasiertem kastrationsresistenten Prostatakarzinom. Tagawa et al. zeigten, dass die fraktionierte Gabe (2 Infusionen im Abstand von 2 Wochen) des [¹⁷⁷Lu]Lutetium-markierten Antikörpers [¹⁷⁷Lu]Lu-J591, die Applikation einer höheren Dosis ermöglicht (Tagawa et al., 2019b). Die Autoren zeigten zudem in einer weiteren Studie, dass in einem einzelnen Zyklus bis zu 22,2 GBq [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 in fraktionierter Form ohne gravierende Nebenwirkungen verabreicht werden können (Tagawa et al., 2019a). Hierin liegt eine zweite Fragestellung zukünftiger in-vitro-Untersuchungen begründet: Um die Kausalität zwischen den unterschiedlichen Modellen der Dosisfraktionierung der [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-Therapie und der Tumorkontrolle genauer darzustellen, sind weitere in-vitro-Studien notwendig. Als Setup wäre eine wiederholte Exposition der Tumorzellen mit ansteigenden Aktivitätskonzentrationen [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 unter Variation des Applikationsintervalls denkbar. Zudem wäre eine Modellierung der Blutpoolkonzentration des Radiopharmakons durch sequentielle Verdünnung des Zellkulturmediums ein möglicher Ansatzpunkt für nachfolgende in-vitro-Versuche, um die Kulturbedingungen weiter der in-vivo-Situation anzunähern. Im Rahmen dieses Versuchsaufbaus könnten zudem Effekte einer wiederholten Exposition auf die Expression des PSMA-Rezeptors sowie auf das Uptakeverhalten der exponierten Zellen untersucht werden. Okamoto et al. beschrieben eine signifikante Abnahme der Dosis im Tumorgewebe mit zunehmender Anzahl an Therapiezyklen (Okamoto et al., 2017). Die Ursache dessen bleibt für die Autoren unklar. Als mögliche Ursachen werden die Verringerung des Zielvolumens und die damit verbundene Reduktion der Anzahl an PSMA-Bindungsstellen postuliert. Ein verändertes Uptake-verhalten sowie eine aberrierende PSMA-Expression der Tumorzellen durch die vorangegangenen Therapiezyklen stellen eine alternative Hypothese dar. Auch hier könnten sequenzielle in-vitro-Zellversuche ansetzen.

Ein weiterer für die Effektivität der Therapie mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 relevanter Aspekt ist die subzelluläre Verteilung des Radiopharmakons (Bavelaar et al., 2018). Akkumuliert dies nahe dem Zellkern, beispielsweise im Golgiapparat, führt dies zu einer signifikanten Steigerung der Dosis im Zellkern (Tamborino et al., 2020). Dies könnte wiederum mit einem verringerten Zellüberleben einhergehen. Zhu et al. zeigen, dass mit [²²⁵Ac]Actinium konjugierte Nannocarrier, welche an den PSMA-Rezeptor binden, durch ihre Lokalisation nahe dem Zellkern eine höhere Zytotoxizität entwickeln als entsprechend markierte PSMA-Antikörper, welche nahe der Zellmembran lokalisiert wurden (Zhu et al., 2016). Die in dieser Studie diskutierte Bedeutung der subzellulären Lokalisation des α -Emitters ist gegenüber den in den

übrigen Studien diskutierten β -Emittern erwartungsgemäß höher. Zusätzlich ist eine mögliche Speicherung von [^{177}Lu]Lu-PSMA in den Lysosomen, sowie dessen Externalisierung in die Überlegungen zur subzellulären Verteilung mit in Betracht zu ziehen. Eine Externalisierung der Radiopharmaka würde zu einer signifikant geringeren Dosis im Zellkern als bisher angenommen führen. Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie der LNCaP-Zellen, welche nur PSMA exprimierende Epithelzellen der Prostata enthält, spiegelt nicht die Zusammensetzung einer Metastase in-vivo wieder. Um die Übertragbarkeit einer in vitro-Dosisberechnung auf eine in-vivo-Situation zu verbessern, wären Untersuchungen an Primärkulturen, welche verschiedene Zellarten enthalten aus beispielsweise einer Biopsie, nötig. Weitere in vitro-Versuche zur Untersuchung des intrazellulären Stoffwechsels und der Externalisierung des Radiopharmakons würden somit zur genaueren Dosisberechnung und damit zur Evaluation der Therapieeffektivität beitragen.

Im Rahmen diese Arbeit wurde ein Vorschlag zur Untersuchung von Dosis-Wirkungsbeziehungen in der Zellkultur mit Anwendung auf die makroskopische Situation unterbreitet. Um diesen Ansatz weiterzuentwickeln, müssten systematisch alle bekannten Prostatazelllinien nach diesem Schema untersucht werden und eine Datenbank zu zellulären Dosis-Wirkungsbeziehung aufgebaut werden. Im Anschluss müsste vergleichend eine weitere Population von Patienten bezüglich ihrer kumulierten Aktivitäten, sowie der Kinetik des Uptakes der Metastasen untersucht werden.

9 Thesen

1. Die Aufnahmekinetik und Bindungsspezifität der Radiopharmaka [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 und [^{177}Lu]Lu-X-Komplex ist von der Zelllinie abhängig.
2. Eine Verringerung der Temperatur bei Exposition der LNCaP-Zellen mit [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 oder dem [^{177}Lu]Lu-X-Komplex führt zur einer Verringerung der zellulären Aufnahme des Radiopharmakons. Die Internalisierung des Radiopharmakons erfolgt somit über Endozytosemechanismen.
3. Die nicht PSMA-exprimierenden Zellen der PC3-Zelllinie zeigen wie erwartet keine signifikante Aufnahme von ^{177}Lu]Lu-PSMA-617, wohl aber vom [^{177}Lu]Lu-X-Komplex.
4. Mit Hilfe des [^{177}Lu]Lu-X-Komplex kann eine höhere kumulative Aktivität je LNCaP-Zelle als durch Exposition mit [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 erreicht werden.
5. Trotz gleicher kumulierter Aktivitäten in-vitro wie im Patienten entsteht eine signifikant unterschiedliche Dosisdeposition im Zielvolumen. Ursächlich dafür sind:
 - a. Die unterschiedliche Höhe der deponierten Energie, welches unter anderem durch die *S*-Werte abgebildet wird.
 - b. Unterschiedliche Aktivitätskonzentrationsverläufe der Radiopharmaka im Zellkulturmedium gegenüber dem Blutpool.
 - c. Die inhomogene Zusammensetzung einer Metastase, welche sowohl aus PSMA-exprimierenden Epithelzellen (60%) als auch aus nicht PSMA-exprimierenden Stromazellen (30%) besteht.
6. Im Rahmen der Zellversuche können kumulierte Aktivitäten in ähnlicher Höhe wie im Patienten erreicht werden, wobei die Exposition der LNCaP-Zellen mit 0,5 MBq/2 ml und 1 MBq/2 ml den exemplarisch untersuchten in-vivo-Situationen am nächsten kommen.
7. Eine hypothetische Metastase auf Basis der Exposition der LNCaP-Zellen mit 0,5 MBq/2 ml [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 erreicht eine mit der Weichteilmetastase des Patienten vergleichbare Dosis (52 Gy Zellkultur / 55 Gy Patientenmetastase). Hingegen kann durch Exposition der LNCaP-Zellen mit 1 MBq/2 ml [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 eine mit der Knochenmetastase des Patienten vergleichbare Dosis erreicht werden (91 Gy Zellkultur / 97 Gy Patientenmetastase).
8. Gleiche mikroskopisch und makroskopisch kumulierte Aktivitäten haben aufgrund einer unterschiedlichen Dosisdeposition eine unterschiedliche Wirkung.

9. Im untersuchten Dosisbereich (4-6 Gy) führt die Exposition der LNCaP-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 zu einem verringertem Zellüberleben.
10. Eine Verringerung des Zellüberlebens der PC3-Zellen ist nach einer Exposition mit 6,7 Gy durch Inkubation mit 3 MBq/2 ml des [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplexes zu beobachten.
11. Bei vergleichbarer Dosisdeposition in den LNCaP- und PC3-Zellen (6 Gy) ist bei beiden Zelllinien ein Rückgang des Zellüberlebens zu beobachten.
12. Die Exposition der LNCaP-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 führt zu einer Veränderung des Zellzyklus, jedoch nicht zu einer Zunahme der Zellen in der Sub-G1-Fraktion.
13. Die mit Hilfe von [¹⁸F]FLT bestimmte Zellvitalität bleibt von der Exposition mit den beiden Radiopharmaka unbeeinflusst.
14. In Zellen der PC3-Zelllinie werden bei Exposition mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 weder durch den geringen unspezifischen Uptake noch durch cross dose-Beiträge Dosen erzielt, die eine in diesem Versuchssetup nachweisbare Wirkung zeigen.
15. Der [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex eignet sich als Radiopharmakon zur Untersuchung von Dosis-Wirkungsbeziehungen. Er bietet eine mögliche Alternative um das Radioisotop [¹⁷⁷Lu]Lutetium in LNCaP- oder in PC3-Zellen zu deponieren.

10 Anhang

10.1 Literaturverzeichnis

- A. GOSEWISCH, HARUN ILHAN, LENA VOMACKA und GUIDO BÖNING, 2018. Dosimetrie bei der Radionuklidtherapie mit Lu-177 [online]. *Der Nuklearmediziner*, **41**(01), 69-80. ISSN 1439-5800. Verfügbar unter: doi:10.1055/s-0043-122171
- ABE, K., M. YOSHIDA, T. USUI, S. HORINOUCI und T. BEPPU, 1991. Highly synchronous culture of fibroblasts from G2 block caused by staurosporine, a potent inhibitor of protein kinases [online]. *Experimental Cell Research*, **192**(1), 122-127. ISSN 0014-4827. Verfügbar unter: doi:10.1016/0014-4827(91)90166-R
- ABUQBEITAH, M., M. DEMIR, L. USLU-BEŞLI, N. YEYIN und K. SÖNMEZOĞLU, 2018. Blood clearance and occupational exposure for 177Lu-DOTATATE compared to 177Lu-PSMA radionuclide therapy [online]. *Radiation and Environmental Biophysics*, **57**(1), 55-61. ISSN 1432-2099. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00411-017-0721-6
- AHMADZADEHFAR, H., E. EPPARD, S. KÜRPIG, R. FIMMERS, A. YORDANOVA, C.D. SCHLENKHOF, F. GÄRTNER, S. ROGENHOFER und M. ESSLER, 2016. Therapeutic response and side effects of repeated radioligand therapy with 177Lu-PSMA-DKFZ-617 of castrate-resistant metastatic prostate cancer [online]. *Oncotarget*, **7**(11), 12477-12488. ISSN 1949-2553. Verfügbar unter: doi:10.18632/oncotarget.7245
- BACCALA, A., L. SERCIA, J. LI, W. HESTON und M. ZHOU, 2007. Expression of prostate-specific membrane antigen in tumor-associated neovasculature of renal neoplasms [online]. *Urology*, **70**(2). ISSN 1527-9995. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.urology.2007.03.025
- BANERJEE, S., M.R.A. PILLAI und F.F.R. KNAPP, 2015. Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: linking chemistry, radiochemistry, and practical applications [online]. *Chemical Reviews*, **115**(8), 2934-2974. ISSN 0009-2665. Verfügbar unter: doi:10.1021/cr500171e
- BARDIÈS, M. und J.F. CHATAL, 1994. Absorbed doses for internal radiotherapy from 22 beta-emitting radionuclides: beta dosimetry of small spheres [online]. *Physics in Medicine & Biology*, **39**(6), 961-981. ISSN 0031-9155. Verfügbar unter: doi:10.1088/0031-9155/39/6/004
- BAVELAAR, B.M., B.Q. LEE, M.R. GILL, N. FALZONE und K.A. VALLIS, 2018. Subcellular Targeting of Theranostic Radionuclides [online]. *Frontiers in Pharmacology*, **9**, 996. ISSN 1663-9812. Verfügbar unter: doi:10.3389/fphar.2018.00996
- BELMOKHTAR, C.A., J. HILLION und E. SÉGAL-BENDIRDJIAN, 2001. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms [online]. *Oncogene*, **20**(26), 3354-3362. ISSN 0950-9232. Verfügbar unter: doi:10.1038/sj.onc.1204436
- BfS - Wie wirkt Strahlung?* [online], 26 Februar 2020 [Zugriff am: 26. Februar 2020]. Verfügbar unter: <https://www.bfs.de/DE/themen/ion/wirkung/einfuehrung/einfuehrung.html>
- BÖRGERMANN, C., 2009. Früherkennung des Prostatakarzinoms [online]. *ärztebaltt*. *ärztebaltt*. Verfügbar unter: <https://www.aerzteblatt.de/int/article.asp?id=64647>

- CATHOMAS, R., T. STEUBER und S. GILLESSEN, 2013. Das metastasierte Prostatakarzinom: Grundlagen der Therapie im Jahr 2013 [online]. *Wiener klinisches Magazin*, **16**(6), 20-25. ISSN 1613-7817. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00740-013-0157-9
- CHAN, H.S., E. de BLOIS, A. MORGENSTERN, F. BRUCHERTSEIFER, M. de JONG, W. BREEMAN und M. KONIJNENBERG, 2017. In Vitro comparison of ²¹³Bi- and ¹⁷⁷Lu-radiation for peptide receptor radionuclide therapy [online]. *PloS one*, **12**(7), e0181473. PloS one. Verfügbar unter: doi:10.1371/journal.pone.0181473
- CHAPPELL, W.H., B.D. LEHMANN, D.M. TERRIAN, S.L. ABRAMS, L.S. STEELMAN und J.A. MCCUBREY, 2012. p53 expression controls prostate cancer sensitivity to chemotherapy and the MDM2 inhibitor Nutlin-3 [online]. *Cell Cycle*, **11**(24), 4579-4588. ISSN 1538-4101. Verfügbar unter: doi:10.4161/cc.22852
- CHATTERJEE, A., G. WATSON, E. MYINT, P. SVED, M. MCENTEE und R. BOURNE, 2015. Changes in Epithelium, Stroma, and Lumen Space Correlate More Strongly with Gleason Pattern and Are Stronger Predictors of Prostate ADC Changes than Cellularity Metrics [online]. *Radiology*, **277**(3), 751-762. Radiology. Verfügbar unter: doi:10.1148/radiol.2015142414
- DAVID A. WEBER, 1991. The MIRD Method of estimating absorbed dose.
- DERTINGER, H. und H. JUNG, 1969. Direkte und indirekte Strahlenwirkung [online]. In: H. DERTINGER und H. JUNG, Hg. *Molekulare Strahlenbiologie. Vorlesungen über die Wirkung ionisierender Strahlen auf elementare biologische Objekte*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 76-98. ISBN 978-3-642-95116-9. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-642-95116-9_6
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR NUKLEARMEDIZIN, 2016. *Therapie mit Lu-177-PSMA, Dosimetrie und Nachsorge beim metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinom* [online]. -Konsensusempfehlung-
- EBERLEIN, U., 2016. *Zusammenhang zwischen physikalischer Dosimetrie und DNA Doppelstrangbrüchen in Lymphozyten nach Radionuklidtherapie* [online]. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-662-59275-5.pdf>
- EMMETT, L., K. WILLOWSON, J. VIOLET, J. SHIN, A. BLANKSBY und J. LEE, 2017. Lutetium 177 PSMA radionuclide therapy for men with prostate cancer: a review of the current literature and discussion of practical aspects of therapy [online]. *Journal of medical radiation sciences*, **64**(1), 52-60. Journal of medical radiation sciences. Verfügbar unter: doi:10.1002/jmrs.227
- EPSTEIN, J.I., L. EGEVAD, M.B. AMIN, B. DELAHUNT, J.R. SRIGLEY und P.A. HUMPHREY, 2016. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System [online]. *The American journal of surgical pathology*, **40**(2), 244-252. ISSN 0147-5185. Verfügbar unter: doi:10.1097/PAS.0000000000000530
- ERNST-GÜNTHER CARL ET AL., 2018. Prostatakrebs-lokal-fortgeschrittenes-Karzinom_Patientenleitlinie_DeutscheKrebshilfe. Prostatakrebs II – Lokal fortgeschrittenes und metastasiertes Prostatakarzinom Ein evidenzbasierter Patientenratgeber zur S3-Leitlinie

Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms (Vierte Auflage, 2018).

FENDLER, W., C. KRATOCHWIL, H. AHMADZADEHFAR, K. RAHBAR, R. BAUM, M. SCHMIDT, A. PFESTROFF, U. LÜTZEN, V. PRASAD, A. HEINZEL, M. HEUSCHKEL, J. RUF, P. BARTENSTEIN und B. KRAUSE, 2016. Therapie mit ¹⁷⁷Lu-PSMA-617, Dosimetrie und Nachsorge beim metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinom [online]. *Nuklearmedizin - NuclearMedicine*, **55**(03), 123-128. ISSN 2567-6407. Verfügbar unter: doi:10.1055/s-0037-1616480

FERLAY, J., I. SOERJOMATARAM, R. DIKSHIT, S. ESER, C. MATHERS, M. REBELO, D.M. PARKIN, D. FORMAN und F. BRAY, 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [online]. *International journal of cancer*, **136**(5), E359-86. ISSN 0020-7136. Verfügbar unter: doi:10.1002/ijc.29210

FITSCHEN, J., B.O. KNOOP, R. BEHRENDT, W.H. KNAPP und L. GEWORSKI, 2011. Äußere Strahlenexposition und effektive Halbwertszeit bei Therapie mit Lu-177-Dota-Tate [online]. *Zeitschrift für medizinische Physik*, **21**(4), 266-273. Zeitschrift für medizinische Physik. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.zemedi.2011.05.001

FRANÇOISE ILLIEN, NICOLAS RODRIGUEZ, MEHDI AMOURA, ALAIN JOLIOT, MANJULA PALLERLA, SOPHIE CRIBIER, FABIENNE BURLINA und SANDRINE SAGAN. Quantitative fluorescence spectroscopy and flow cytometry analyses of cell-penetrating peptides internalization pathways: optimization, pitfalls, comparison with mass spectrometry quantification [online]. *Scientific Reports*, **6**(1), 1-13. ISSN 2045-2322. Verfügbar unter: doi:10.1038/srep36938

FREUDENBERG, R., M. WENDISCH und J. KOTZERKE, 2011. Geant4-Simulations for cellular dosimetry in nuclear medicine [online]. *Zeitschrift für Medizinische Physik*, **21**(4), 281-289. ISSN 0939-3889. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.zemedi.2011.08.003

Gamma Counter, 2020. In: R.S. KHANDPUR, Hg. *Compendium of biomedical instrumentation*. Hoboken: John Wiley, S. 871-874. ISBN 9781119288121.

GAUPEL, A.-C., W.-L.W. WANG, S. MORDAN-MCCOMBS, E.C. YU LEE und M. TENNISWOOD, 2013. Chapter 39 - Xenograft, Transgenic, and Knockout Models of Prostate Cancer [online]. In: P.M. CONN, Hg. *Animal Models for the Study of Human Disease*. Burlington: Elsevier Science, S. 973-995. ISBN 978-0-12-415894-8. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124158948000397>

GE HEALTHCARE, 2015. *Nutzerhandbuch Fastlab2 Synthesizer*. DOC1705997.

German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details [online], 4 Dezember 2020a [Zugriff am: 4. Dezember 2020]. Verfügbar unter: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-256>

German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details [online], 4 Dezember 2020b [Zugriff am: 4. Dezember 2020]. Verfügbar unter: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-465>

GHOSH, A. und W.D.W. HESTON, 2004. Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer [online]. *Journal of cellular biochemistry*, **91**(3), 528-539. ISSN 0730-2312. Verfügbar unter: doi:10.1002/jcb.10661

- GOMPF, A., A. DORN-BEINEKE, O. FREY, M. KLOUCHE, A. SCHEFFOLD, P. BACHER, F. KERN, B. GIEBEL, C.T. NEBE, H. RENZ und U. SACK, 2016. *Zelluläre Diagnostik und Therapie* [online]. Berlin/Boston: De Gruyter. ISBN 9783110344066. Verfügbar unter: <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=4191091>
- GORGES, T.M., S. RIETHDORF, O. von AHSEN, P. NASTAŁY, K. RÖCK, M. BOEDE, S. PEINE, A. KUSKE, E. SCHMID, C. KNEIP, F. KÖNIG, M. RUDOLPH und K. PANTEL, 2016. Heterogeneous PSMA expression on circulating tumor cells - a potential basis for stratification and monitoring of PSMA-directed therapies in prostate cancer [online]. *Oncotarget*, **7**(23), 34930-34941. ISSN 1949-2553. Verfügbar unter: doi:10.18632/oncotarget.9004
- GRUNERT, J.-H., 2019. *Strahlenschutz für Röntgendiagnostik und Computertomografie. Grundkurs und Spezialkurse*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Springer. ISBN 3662592754.
- H. ILHAN, C. LA FOUGÈRE und B. J. KRAUSE, 2020. PSMA-basierte Theranostik beim Prostatakarzinom [online]. *Der Urologe*, **59**(5), 617-625. ISSN 1433-0563. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00120-020-01193-x
- HAAKE, A.R. und R.R. POLAKOWSKA, 1993. Cell death by apoptosis in epidermal biology [online]. *The Journal of investigative dermatology*, **101**(2), 107-112. ISSN 0022-202X. Verfügbar unter: doi:10.1111/1523-1747.ep12363594
- HACKER, U., R. ALBRECHT und M. MANIAK, 1997. Fluid-phase uptake by macropinocytosis in Dictyostelium [online]. *Journal of cell science*, **110 (Pt 2)**, 105-112. ISSN 0021-9533. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9044041/>
- HARING, ANDREA, 2021. S3-Leitlinie Prostatakarzinom [online] [Zugriff am: 26. September 2021]. Verfügbar unter: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Prostatakarzinom/Version_6/LL_Prostatakarzinom_Langversion_6.1.pdf
- HOLMES, E.H., 2001. PSMA specific antibodies and their diagnostic and therapeutic use [online]. *Expert opinion on investigational drugs*, **10**(3), 511-519. ISSN 1354-3784. Verfügbar unter: doi:10.1517/13543784.10.3.511
- HOROSZEWICZ, J.S., S.S. LEONG, E. KAWINSKI, J.P. KARR, H. ROSENTHAL, T.M. CHU, E.A. MIRAND und G.P. MURPHY, 1983. LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma [online]. *Cancer Research*, **43**(4), 1809-1818. ISSN 1538-7445. Verfügbar unter: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/43/4/1809.full.pdf>
- JANET S. RASEY, JOHN R. GRIERSON, LINDA W. WIENS, PAMELLA D. KOLB und JEFFREY L. SCHWARTZ, 2002. Validation of FLT Uptake as a Measure of Thymidine Kinase-1 Activity in A549 Carcinoma Cells. *Journal of Nuclear Medicine*, **43**(9), 1210-1217. ISSN 2159-662X.
- JOSSON, S., Y. XU, F. FANG, S.K. DHAR, D.K. ST CLAIR und W.H. ST CLAIR, 2006. RelB regulates manganese superoxide dismutase gene and resistance to ionizing radiation of prostate cancer cells [online]. *Oncogene*, **25**(10), 1554-1559. ISSN 0950-9232. Verfügbar unter: doi:10.1038/sj.onc.1209186
- KABASAKAL, L., T. TOKLU, N. YEYIN, E. DEMIRCI, M. ABUQBEITAH, M. OCAK, A. AYGÜN, E. KARAYEL, H. PEHLIVANOĞLU und N. ALAN SELÇUK, 2017. Kastrasyona

Dirençli Prostat Kanseri Hastalarında Lu-177-PSMA-617 ile Prostat Spesifik Membran Antijen İnhibitor Tedavisi [online]. Kararlılık, Biyodağılım ve Dozimetri. *Molecular imaging and radionuclide therapy*, **26**(2), 62-68. ISSN 2146-1414. Verfügar unter: doi:10.4274/mirt.08760

KAIGHN, M.E., K.S. NARAYAN, Y. OHNUKI, J.F. LECHNER und L.W. JONES, 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology*, **17**(1), 16-23. ISSN 0021-0005.

KOZIKOWSKI, A.P., F. NAN, P. CONTI, J. ZHANG, E. RAMADAN, T. BZDEGA, B. WROBLEWSKA, J.H. NEALE, S. PSHENICHKIN und J.T. WROBLEWSKI, 2001. Design of remarkably simple, yet potent urea-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II (NAALADase) [online]. *Journal of Medicinal Chemistry*, **44**(3), 298-301. ISSN 0022-2623. Verfügar unter: doi:10.1021/jm000406m

KRATOCHWIL, C., A. AFSHAR-OROMIEH, K. KOPKA, U. HABERKORN und F.L. GIESEL, 2016a. Current Status of Prostate-Specific Membrane Antigen Targeting in Nuclear Medicine: Clinical Translation of Chelator Containing Prostate-Specific Membrane Antigen Ligands Into Diagnostics and Therapy for Prostate Cancer [online]. *Seminars in Nuclear Medicine*, **46**(5), 405-418. ISSN 0001-2998. Verfügar unter: doi:10.1053/j.semnuclmed.2016.04.004

KRATOCHWIL, C., F.L. GIESEL, M. STEFANOVA, M. BENEŠOVÁ, M. BRONZEL, A. AFSHAR-OROMIEH, W. MIER, M. EDER, K. KOPKA und U. HABERKORN, 2016b. PSMA-Targeted Radionuclide Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with ¹⁷⁷Lu-Labeled PSMA-617 [online]. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, **57**(8), 1170-1176. ISSN 1535-5667. Verfügar unter: doi:10.2967/jnumed.115.171397

KRIEGER, H., 2019. *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. ISBN 978-3-662-60583-7.

LEDDA-COLUMBANO, G.M., P. CONI, M. CURTO, L. GIACOMINI, G. FAA, S. OLIVERIO, M. PIACENTINI und A. COLUMBANO, 1991. Induction of two different modes of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide [online]. *The American journal of pathology*, **139**(5), 1099-1109. ISSN 0002-9440. Verfügar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1683163/>

LEVENT KABASAKAL, MOHAMMAD ABUQBEITAH, ASLAN AYGÜN, NAMI YEYIN, MELTEM OCAK, EMRE DEMIRCI und TURKAY TOKLU, 2015. Pre-therapeutic dosimetry of normal organs and tissues of ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 prostate-specific membrane antigen (PSMA) inhibitor in patients with castration-resistant prostate cancer [online]. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **42**(13), 1976-1983. ISSN 1619-7089. Verfügar unter: doi:10.1007/s00259-015-3125-3

LI, Z., C.J. CHEN, J.K. WANG, E. HSIA, W. LI, J. SQUIRES, Y. SUN und J. HUANG, 2013. Neuroendocrine differentiation of prostate cancer [online]. *Asian Journal of Andrology*, **15**(3), 328-332. ISSN 1008-682X. Verfügar unter: doi:10.1038/aja.2013.7

LIU, H., A.K. RAJASEKARAN, P. MOY, Y. XIA, S. KIM, V. NAVARRO, R. RAHMATI und N.H. BANDER, 1998. Constitutive and Antibody-induced Internalization of Prostate-

specific Membrane Antigen [online]. *Cancer Research*, **58**(18), 4055-4060. ISSN 1538-7445. Verfügbar unter: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/58/18/4055.full.pdf>

MALSY, M., D. BITZINGER, B. GRAF und A. BUNDSCHERER, 2019. Staurosporine induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells PaTu 8988t and Panc-1 via the intrinsic signaling pathway [online]. *European Journal of Medical Research*, **24**(1), 5. ISSN 2047-783X. Verfügbar unter: doi:10.1186/s40001-019-0365-x

MANNWEILER, S., P. AMERSDORFER, S. TRAJANOSKI, J.A. TERRETT, D. KING und G. MEHES, 2009. Heterogeneity of prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in prostate carcinoma with distant metastasis [online]. *Pathology oncology research : POR*, **15**(2), 167-172. ISSN 1219-4956. Verfügbar unter: doi:10.1007/s12253-008-9104-2

MARIA CASTEDO, JEAN-LUC PERFETTINI, THOMAS ROUMIER, KARINE ANDREAU, RENE MEDEMA und GUIDO KROEMER, 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition [online]. *Oncogene*, **23**(16), 2825-2837. ISSN 1476-5594. Verfügbar unter: doi:10.1038/sj.onc.1207528

MAYOR, S. und R.E. PAGANO, 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis [online]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**(8), 603-612. ISSN 1471-0080. Verfügbar unter: doi:10.1038/nrm2216

MINEO, C. und R.G. ANDERSON, 2001. Potocytosis. Robert Feulgen Lecture [online]. *Histochemistry and cell biology*, **116**(2), 109-118. ISSN 0948-6143. Verfügbar unter: doi:10.1007/s004180100289

MOLZAHN, D., J. AARLE, A. MERKLIN, B. JÄCKEL, W. WESTMEIER und P. PATZELT, 1987. Untersuchungen zur biologischen Halbwertszeit von Caesium in Rehwild [online]. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*, **33**(2), 89-97. ISSN 1439-0574. Verfügbar unter: doi:10.1007/BF02241758

MÜLLER-LISSE, U.L. und A. HOFSTETTER, 2003. Urologische Diagnostik des Prostatakarzinoms [online]. *Der Radiologe*, **43**(6), 432-440. ISSN 1432-2102. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00117-003-0913-8

NANABALA, R., A. SASIKUMAR, A. JOY und M.R. PILLAI, 2016. Preparation of [177Lu]PSMA-617 Using Carrier Added (CA) 177Lu for Radionuclide Therapy of Prostate Cancer [online]. *Nuclear Medicine & Radiation Therapy*, **7**(5), 1-7. ISSN 2155-9619. Verfügbar unter: doi:10.4172/2155-9619.1000306

NOBUYUKI OYAMA, DATTA E. PONDE, CARMEN DENCE, JOONYOUNG KIM, YUAN-CHUAN TAI und MICHAEL J. WELCH, 2004. Monitoring of Therapy in Androgen-Dependent Prostate Tumor Model by Measuring Tumor Proliferation. *Journal of Nuclear Medicine*, **45**(3), 519-525. ISSN 2159-662X.

Nuklearmedizin, 2008: Thieme Verlag. Nuklearmedizin. ISBN 9783131185044. Verfügbar unter: <http://www.thieme-connect.de/products/ebooks/pdf/10.1055/b-0036-137115.pdf>

OCHAB-MARCINEK, A., E. GUDOWSKA-NOWAK, E. NASONOVA und S. RITTER, 2009. Modeling radiation-induced cell cycle delays [online]. *Radiation and Environmental Biophysics*, **48**(4), 361-370. ISSN 1432-2099. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00411-009-0239-7

OH, P., T. HORNER, H. WITKIEWICZ und J.E. SCHNITZER, 2012. Endothelin induces rapid, dynamin-mediated budding of endothelial caveolae rich in ET-B [online]. *Journal of Biological Chemistry*, **287**(21), 17353-17362. ISSN 1083-351X. Verfügbar unter: doi:10.1074/jbc.M111.338897

OKAMOTO, S., A. THIEME, J. ALLMANN, C. D'ALESSANDRIA, T. MAURER, M. RETZ, R. TAUBER, M.M. HECK, H.-J. WESTER, N. TAMAKI, W.P. FENDLER, K. HERRMANN, C.H. PFOB, K. SCHEIDHAUER, M. SCHWAIGER, S. ZIEGLER und M. EIBER, 2017. Radiation Dosimetry for ¹⁷⁷Lu-PSMA I&T in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Absorbed Dose in Normal Organs and Tumor Lesions [online]. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, **58**(3), 445-450. ISSN 1535-5667. Verfügbar unter: doi:10.2967/jnumed.116.178483

OPENSTAX, 22.8.12. *Outcome: The Cell Cycle* [online]. 25. Januar 2013 [Zugriff am: 20.2.20]. Verfügbar unter: <https://courses.lumenlearning.com/ivytech-bio1-1/chapter/outcome-the-cell-cycle/>

ORMEROD, M.G., 2002. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry [online]. *Journal of Immunological Methods*, **265**(1), 73-80. ISSN 0022-1759. Verfügbar unter: doi:10.1016/S0022-1759(02)00071-6

ORTIZ-FERRON, G., 9. Juli 2016. The Proper Way To Use The Sub-G1 Assay [online]. *Science Squared Ltd* [Zugriff am: 14. Februar 2021]. Verfügbar unter: <https://bitesizebio.com/25876/the-proper-way-to-use-the-sub-g1-assay-tips-tricks-and-secrets/>

PARK, S., R.R. ANG, S.P. DUFFY, J. BAZOV, K.N. CHI, P.C. BLACK und H. MA, 2014. Morphological Differences between Circulating Tumor Cells from Prostate Cancer Patients and Cultured Prostate Cancer Cells [online]. *PloS one*, **9**(1). PloS one. Verfügbar unter: doi:10.1371/journal.pone.0085264

PARTON, R.G., V.A. TILLU und B.M. COLLINS, 2018. Caveolae [online]. *Current biology : CB*, **28**(8), R402-R405. Current biology : CB. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.cub.2017.11.075

PETER M. SMITH-JONES, SHANKAR VALLABHAJOSULA, STANLEY J. GOLDSMITH, VINCENT NAVARRO, CATHERINE J. HUNTER, DIEGO BASTIDAS und NEIL H. BANDER, 2000. In Vitro Characterization of Radiolabeled Monoclonal Antibodies Specific for the Extracellular Domain of Prostate-specific Membrane Antigen [online]. *Cancer Research*, **60**(18), 5237-5243. ISSN 1538-7445. Verfügbar unter: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/60/18/5237.long>

PETERS, S.M.B., R. HOFFERBER, B.M. PRIVÉ, M. de BAKKER, M. GOTTHARDT, M. JANSSEN, F. de LANGE, C.H.J. MUSELAERS, N. MEHRA, J.A. WITJES, P.F. COSTA, J. NAGARAJAH, M.W. KONIJNENBERG und W. JENTZEN, 2021. [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 PET imaging as a predictor for absorbed doses in organs at risk and small lesions in [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 treatment [online]. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 1-12. ISSN 1619-7089. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00259-021-05538-2

Prostatakarzinom - Diagnostik und Staging [online], 2007. *Radiologie up2date*, **7**(02), 95-112. ISSN 1617-8300. Verfügbar unter: doi:10.1055/s-2007-966498

- RAJASEKARAN, A.K., 2005. Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein? [online]. *American journal of physiology. Cell physiology*, **288**(5), C975-81. ISSN 0363-6143. Verfügbar unter: doi:10.1152/ajpcell.00506.2004
- ROCHE DIAGNOSTICS GMBH, Hg., 2010. *Manual CASY TT*.
- ROLLE, M. und A. MAYR, Hg., 2007. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 8., überarb. Aufl. Stuttgart: Enke. ISBN 9783830410607.
- ROTHER, G., 2007. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: U. SACK, Hg. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen*. Basel: KARGER, S. 27-70. ISBN 3-8055-7928-4.
- SAGA, R., Y. MATSUYA, R. TAKAHASHI, K. HASEGAWA, H. DATE und Y. HOSOKAWA, 2019. Analysis of the high-dose-range radioresistance of prostate cancer cells, including cancer stem cells, based on a stochastic model [online]. *Journal of radiation research*, **60**(3), 298-307. *Journal of radiation research*. Verfügbar unter: doi:10.1093/jrr/trz011
- SALIM, R. und P. TAHERPARVAR, 2019. Monte Carlo single-cell dosimetry using Geant4-DNA: the effects of cell nucleus displacement and rotation on cellular S values [online]. *Radiation and Environmental Biophysics*, **58**(3), 353-371. ISSN 1432-2099. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00411-019-00788-z
- SARTOR, O., J. de BONO, K.N. CHI, K. FIZAZI, K. HERRMANN, K. RAHBAR, S.T. TAGAWA, L.T. NORDQUIST, N. VAISHAMPAYAN, G. EL-HADDAD, C.H. PARK, T.M. BEER, A. ARMOUR, W.J. PÉREZ-CONTRERAS, M. DESILVIO, E. KPAMEGAN, G. GERICKE, R.A. MESSMANN, M.J. MORRIS und B.J. KRAUSE, 2021. Lutetium-177-PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer [online]. *The New England journal of medicine*, **385**(12), 1091-1103. *The New England journal of medicine*. Verfügbar unter: doi:10.1056/NEJMoa2107322
- SAZAN RASUL, MARCUS HACKER, ELISABETH KRETSCHMER-CHOTT, ASHA LEISSER, BERNHARD GRUBMÜLLER, GERO KRAMER, SHAHROKH SHARIAT, WOLFGANG WADSAK, MARKUS MITTERHAUSER, MARKUS HARTENBACH und ALEXANDER R. HAUG, 2020. Clinical outcome of standardized 177 Lu-PSMA-617 therapy in metastatic prostate cancer patients receiving 7400 MBq every 4 weeks [online]. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **47**(3), 713-720. ISSN 1619-7089. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00259-019-04584-1
- SCHAFER, K.A., 1998. The cell cycle: a review [online]. *Veterinary pathology*, **35**(6), 461-478. ISSN 0300-9858. Verfügbar unter: doi:10.1177/030098589803500601
- SCHLEGEL, W., C.P. KARGER und O. JÄKEL, Hg., 2018. *Medizinische Physik. Grundlagen - Bildgebung - Therapie - Technik* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. ISBN 9783662548004. Verfügbar unter: <https://www.osti.gov/servlets/purl/5915860>
- SCHLEMMER, H.-P., 2008. Prostatakarzinom [online]. *Der Radiologe*, **48**(1), 45-51. ISSN 1432-2102. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00117-007-1555-z
- SCHMITZ, S. und C. DESEL, 2018. *Der Experimentator Zellbiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Experimentator. ISBN 9783662561102.

- SCHÖTZIG, U., H. SCHRADER, E. SCHÖNFELD, E. GÜNTHER und R. KLEIN, 2001. Standardisation and decay data of ¹⁷⁷Lu and ¹⁸⁸Re [online]. *Applied Radiation and Isotopes*, **55**(1), 89-96. ISSN 09698043. Verfügbar unter: doi:10.1016/S0969-8043(00)00362-6
- STABIN, M.G., 2008. Uncertainties in internal dose calculations for radiopharmaceuticals [online]. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, **49**(5), 853-860. ISSN 1535-5667. Verfügbar unter: doi:10.2967/jnumed.107.048132
- TAGAWA, S.T., J.R. OSBORNE, A. HACKETT, M.J. NIAZ, V. COOLEY, P. CHRISTOS, P.J. VLACHOSTERGIOS, C. THOMAS, L. GRACEY, H. BELTRAN, A.M. MOLINA, D.M. NANUS, J. BABICH, S. VALLABHAJOSULA, O. SARTOR, K. BALLMAN und N.H. BANDER, 2019a. Preliminary results of a phase I/II dose-escalation study of fractionated dose ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 for progressive metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC) [online]. *Annals of Oncology*, **30**, v329-v330. ISSN 0923-7534. Verfügbar unter: doi:10.1093/annonc/mdz248.006
- TAGAWA, S.T., S. VALLABHAJOSULA, P.J. CHRISTOS, Y.S. JHANWAR, J.S. BATRA, L. LAM, J. OSBORNE, H. BELTRAN, A.M. MOLINA, S.J. GOLDSMITH, N.H. BANDER und D.M. NANUS, 2019b. Phase 1/2 study of fractionated dose lutetium-177-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 (¹⁷⁷Lu-J591) for metastatic castration-resistant prostate cancer [online]. *Cancer*, **125**(15), 2561-2569. ISSN 0008-543X. Verfügbar unter: doi:10.1002/cncr.32072
- TAI, S., Y. SUN, J.M. SQUIRES, H. ZHANG, W.K. OH, C.-Z. LIANG und J. HUANG, 2011. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma [online]. *The Prostate*, **71**(15), 1668-1679. The Prostate. Verfügbar unter: doi:10.1002/pros.21383
- TAJIK-MANSOURY, M.A., 2016. Cellular S-value of beta emitter radionuclide's determined using Geant4 Monte Carlo toolbox, comparison to MIRD S-values [online]. *Iranian Journal of Nuclear Medicine*, **24**(1), 37-45. ISSN 1681-2824. Verfügbar unter: http://irjnm.tums.ac.ir/article_15757.html
- TAMBORINO, G., M. de SAINT-HUBERT, L. STRUELENS, D.C. SEOANE, E.A.M. RUIGROK, an AERTS, W.A. VAN CAPPELLEN, M. de JONG, M.W. KONIJNENBERG und J. NONNEKENS, 2020. Cellular dosimetry of ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tyr3octreotate radionuclide therapy: the impact of modeling assumptions on the correlation with in vitro cytotoxicity [online]. *EJNMMI Physics*, **7**(1), 8. ISSN 2197-7364. Verfügbar unter: doi:10.1186/s40658-020-0276-5
- TANEJA, S.S., 2004. ProstaScint(R) Scan: Contemporary Use in Clinical Practice. *Reviews in Urology*, **6 Suppl 10**(Suppl 10), S19-28. ISSN 1523-6161.
- TAYWADE, S.K., N.A. DAMLE und C. BAL, 2016. PSMA Expression in Papillary Thyroid Carcinoma: Opening a New Horizon in Management of Thyroid Cancer? [online]. *Clinical nuclear medicine*, **41**(5), e263-5. ISSN 1536-0229. Verfügbar unter: doi:10.1097/RLU.0000000000001148
- TËTU, B., J.Y. RO, A.G. AYALA, D.E. JOHNSON, C.J. LOGOTHETIS und N.G. ORDONEZ, 1987. Small cell carcinoma of the prostate part I a clinicopathologic study of 20 cases [online]. *Cancer*, **59**(10), 1803-1809. ISSN 0008-543X. Verfügbar unter: doi:10.1002/1097-0142(19870515)59:10<1803::aid-cncr2820591019>3.0.co;2-x

- TROYER, J.K., M.L. BECKETT und G.L. WRIGHT, JR, 1997. Location of prostate-specific membrane antigen in the LNCaP prostate carcinoma cell line [online]. *The Prostate*, **30**(4), 232-242. The Prostate. Verfügbar unter: doi:10.1002/(sici)1097-0045(19970301)30:4<232::aid-pros2>3.0.co;2-n
- TUXHORN, J.A., G.E. AYALA und D.R. ROWLEY, 2001. Reaktive stroma in prostate cancer progression [online]. *Journal of Urology*, **166**(6), 2472-2483. ISSN 0022-5347. Verfügbar unter: doi:10.1016/S0022-5347(05)65620-0
- VAN DER KOGEL, A. und M. JOINER, 2009. *Basic clinical radiobiology* [online]. 4th ed. London: Hodder Arnold. ISBN 9780340929667. Verfügbar unter: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/subhh/detail.action?docID=564708>
- VAN STEENBRUGGE, G.J., M. GROEN, J.W. VAN DOGEN, J. BOLT, H. VAN DER KORPUT, J. TRAPMAN, M. HASENSEN und J. HOROSZEWICZ, 1989. The human prostatic carcinoma cell line LNCaP and its derivatives [online]. *Urological Research*, **17**(2), 71-77. ISSN 1434-0879. Verfügbar unter: doi:10.1007/BF00262024
- VAN, O.B., S.E. HOVINGH, H. RODERMOND, A. GÜÇLÜ, N. LOSEKOOT, A.A. GELDOF, G.W. BARENDSEN, L.J. STALPERS und N.A. FRANKEN, 2013. Decay of γ -H2AX foci correlates with potentially lethal damage repair in prostate cancer cells [online]. *Oncology reports*, **29**(6). ISSN 1791-2431. Verfügbar unter: doi:10.3892/or.2013.2364
- WECKERMANN, D. und R. HARZMANN, 2004. Hormone therapy in prostate cancer: LHRH antagonists versus LHRH analogues [online]. *European Urology*, **46**(3), 279-83; discussion 283-4. ISSN 0302-2838. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.eururo.2004.05.006
- WEINEISEN, M., M. SCHOTTELIUS, J. SIMECEK, R.P. BAUM, A. YILDIZ, S. BEYKAN, H.R. KULKARNI, M. LASSMANN, I. KLETTE, M. EIBER, M. SCHWAIGER und H.-J. WESTER, 2015. 68Ga- and 177Lu-Labeled PSMA I&T [online]. Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, **56**(8), 1169-1176. ISSN 1535-5667. Verfügbar unter: doi:10.2967/jnumed.115.158550
- YADAV, M.P., S. BALLAL, R.K. SAHOO, S.N. DWIVEDI und C. BAL, 2019. Radioligand Therapy With 177Lu-PSMA for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis [online]. *American Journal of Roentgenology*, **213**(2), 275-285. ISSN 0361-803X. Verfügbar unter: doi:10.2214/AJR.18.20845
- ZHU, C., A. BANDEKAR, M. SEMPKOWSKI, S.R. BANERJEE, M.G. POMPER, F. BRUCHERTSEIFER, A. MORGENSTERN und S. SOFOU, 2016. Nanoconjugation of PSMA-Targeting Ligands Enhances Perinuclear Localization and Improves Efficacy of Delivered Alpha-Particle Emitters against Tumor Endothelial Analogues [online]. *Molecular cancer therapeutics*, **15**(1), 106-113. Molecular cancer therapeutics. Verfügbar unter: doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0207

10.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Vereinfachte Darstellung der Internalisierung von [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617 in Anlehnung an (Ghosh und Heston, 2004)	15
Abbildung 2 Aufbau eines Radiopharmakons.....	16
Abbildung 3: Graphische Darstellung zellulärer S-Werte N: Nukleus, C: Zelle, Cy: Zytoplasma, Cs: Zelloberfläche	21
Abbildung 4: Schematische Darstellung der wichtigsten Übergänge von [¹⁷⁷ Lu]Lutetium in den Grundzustand des [¹⁷⁷ Hf]Hafniums in Anlehnung an (Eberlein, 2016)	24
Abbildung 5 Zellzyklus aus (OpenStax, 22.8.12)	26
Abbildung 6: Struktur der Arbeit und Zielsetzung; Die griechischen Buchstaben dienen der Orientierung innerhalb einzelner Kapitel und Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit.	34
Abbildung 7: Darstellung der Geometrie einer Kavität einer 6-Well Platte mit 2 ml Zellkulturmedium gefüllt	46
Abbildung 8: Darstellung der Aufnahmefunktion (ohne Zerfallskorrektur) für LNCaP mit den Integrationsintervallen: A (0-2 h) Bindung des Radiopharmakons überwiegend an der Membran, B (2-5h) Verteilung des Radiopharmakons zwischen Membran und Zytoplasma zum Messpunkt 2 Stunden aus den Ergebnissen der Versuche zur Bindungsspezifität und Internalisierung übernommen; C (5-24h) und D (24-48h) sowie E (48-72h) liegt die Verteilung des Radiopharmakons zwischen Membran und Zytoplasma zum Messpunkt 5 Stunden in den Versuchen zur Bindungsspezifität und Internalisierung zugrunde.....	50
Abbildung 9 Darstellung der Aufnahmefunktion (ohne Zerfallskorrektur) für PC3 mit den Integrationsintervallen: A (0-2 h) Bindung des Radiopharmakons überwiegend an der Membran, B (2-5h) Verteilung des Radiopharmakons zwischen Membran und Zytoplasma zum Messpunkt 2 Stunden aus den Ergebnissen der Versuche zur Bindungsspezifität und Internalisierung übernommen; C (5-24h) und D (24-48h) sowie E (48-72h) liegt die Verteilung des Radiopharmakons zwischen Membran und Zytoplasma zum Messpunkt 5 Stunden in den Versuchen zur Bindungsspezifität und Internalisierung zugrunde.....	51
Abbildung 10: Gemessene Zählraten je LNCaP-Zelle für den Zeitraum 0-6 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617	59
Abbildung 11: Gemessene Zählrate je LNCaP-Zelle für den Zeitraum 0-24 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617	60
Abbildung 12: Gemessene Zählraten je LNCaP-Zelle für den Zeitraum 0-6 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex	61
Abbildung 13: Gemessene Zählraten je LNCaP-Zelle für den Zeitraum 0-24 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex.....	61
Abbildung 14 Gemessene Zählrate je PC3-Zelle inklusive Leerwerten für den Zeitraum 0-6 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617	63
Abbildung 15: Gemessene Zählrate je PC3-Zelle inklusive Leerwerten für den Zeitraum 0-24 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617 ..	63
Abbildung 16: Gemessene Zählraten je PC3-Zelle inklusive Leerwerten für den Zeitraum 0-6 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex .	64
Abbildung 17: Gemessene Zählraten je PC3-Zelle inklusive Leerwerten für den Zeitraum 0-24 h nach Exposition mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex	65
Abbildung 18: A: Darstellung der membrangebundenen und zytoplasmatischen Fraktion sowie die absolute zellulär gebundenen Aktivität der LNCaP-Zellen nach Exposition mit [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617 bei 37 °C; B: Darstellung der zytoplasmatischen Fraktion der zellulär	

gebundenen Aktivität der LNCaP-Zellen nach Exposition mit [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617 bei 37 °C und 4 °C.....	66
Abbildung 19: A: Darstellung der membrangebundenen und zytoplasmatischen Fraktion sowie die absolute zellulär gebundenen Aktivität der LNCaP-Zellen nach Exposition mit dem [¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex bei 37 °C; B: Darstellung der zytoplasmatischen Fraktion der zellulär gebundenen Aktivität der LNCaP-Zellen nach Exposition mit [¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex bei 37 °C und 4 °C	67
Abbildung 20 Zellzahl der LNCaP-Zellen über 48 h nach Bestrahlung mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex.....	69
Abbildung 21: Zellzahl der PC3-Zellen über 48 h nach Bestrahlung mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617.....	70
Abbildung 22 Zellzahlen der PC3-Zellen über 48 h nach Bestrahlung mit 0,5 MBq/2 ml, 1 MBq/2 ml und 3 MBq/2 ml [¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex.....	71
Abbildung 23: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen der LNCaP-Zellen 24 h nach Exposition mit 1 MBq/2 ml [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617.....	73
Abbildung 24: zelluläre Zählrate in A cpm/Zelle B cpm/Well 48h nach Exposition der LNCaP-Zellen mit entweder [¹⁸ F]FLT (FLT Kontrolle) oder [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617 (Lu-PSMA Kontrolle) oder beiden Radionukliden (Lu-PSMA + FLT), gemessen im [¹⁸ F]-Kanal	74
Abbildung 25: Darstellung der zellulären Zählrate in A cpm/Zelle B cpm/Well 48h nach Exposition der LNCaP-Zellen mit entweder [¹⁸ F]FLT (FLT Kontrolle) oder [¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex (Lu-X-Komplex Kontrolle) oder beiden Radionukliden (Lu-X-Komplex + FLT), gemessen im [¹⁸ F]-Kanal.....	74
Abbildung 26: Kinetik des relativen Uptakes der Metastase von Patient 1 und 2 sowie des Uptakes/Zelle bei Exposition der LNCaP-Zellen mit 1 MBq/2 ml [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617 in der Zellkultur	95
Abbildung 27: Blutpoolaktivität von Patient 1 und 2 Aktivitätskonzentration im Zellkulturmedium.....	95
Abbildung 28 Zelllinie LNCaP in 100-facher Vergrößerung mit einer Konfluenz von ca. 50%	121
Abbildung 29 Wachstumskurve der Zelllinie LNCaP mit FKS-haltigem und -freien Medium über 144 h.....	122
Abbildung 30: Zelllinie PC3 in 100-facher Vergrößerung bei einer Konfluenz von circa 80%	122
Abbildung 31: Wachstumskurve der Zelllinie PC3 mit FKS-haltigem und -freien Medium über 144 h.....	123
Abbildung 32: Darstellung der LNCaP-Zellen durch das Messokkular	124
Abbildung 33: Zellzahlen der PC3-Zellen über 48 h nach Inkubation mit der Matrix des [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-Radiopharmakons.....	125
Abbildung 34 Zellzahlen der LNCaP-Zellen 24 h nach 24-stündiger LuCl ₃ -Exposition	126
Abbildung 35 Zellzahlen der PC3-Zellen 24 h nach 24-stündiger LuCl ₃ -Exposition	126
Abbildung 36: Gemessene Zählrate je LNCaP-Zelle nach Exposition mit [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA I&T in Abhängigkeit der Aktivitätskonzentration	127
Abbildung 37 Zahl der LNCaP-Zellen 24 h nach Inkubation mit [¹⁷⁷ Lu]LuPSMA-I&T mit einer Aktivitätskonzentration von 0,09-10 MBq/2 ml	128
Abbildung 38: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen der LNCaP-Zellen 24 h und 48 h nach Exposition mit 2,5 µM Staurosporin	129

Abbildung 39: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen der LNCaP-Zellen 24 h und 48 h nach Exposition mit 25 μ M Staurosporin	130
Abbildung 40: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen der PC3-Zellen 24 h und 48 h nach Exposition mit 2,5 μ M Staurosporin	131
Abbildung 41: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen der PC3-Zellen 24 h und 48 h nach Exposition mit 25 μ M Staurosporin	131
Abbildung 42: Blutpoolkonzentration [177 Lu]Lu-PSMA-617 von Patient 1 und 2 über 72 h	132
Abbildung 43: A: Darstellung der membrangebundenen und zytoplasmatischen Fraktion, sowie die absolute zellulär gebundenen Aktivität der PC3-Zellen nach Exposition mit [177 Lu]LuPSMA-617 bei 37 °C; B: Darstellung der zytoplasmatischen Fraktion der zellulär gebundenen Aktivität der PC3-Zellen nach Exposition mit [177 Lu]Lu-PSMA bei 37 °C und 4 °C.....	133
Abbildung 44: A: Darstellung der membrangebundenen und zytoplasmatischen Fraktion sowie die absolute zellulär gebundenen Aktivität der PC3- Zellen nach Exposition mit dem [177 Lu]Lu-X-Komplex bei 37 °C; B: Darstellung der zytoplasmatischen Fraktion der zellulär gebundenen Aktivität der PC3-Zellen nach Exposition mit [177 Lu]Lu-X-Komplex bei 37°C und 4°C.....	134
Abbildung 45 Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen der PC3-Zellen 24 h nach Exposition mit 1 MBq/2 ml [177 Lu]Lu-PSMA-617.....	135
Abbildung 46: Darstellung der zellulären Zählrate in A cpm/Zelle B cpm/Well 48h nach Exposition der PC3-Zellen mit entweder [18 F]FLT (FLT Kontrolle) oder [177 Lu]Lu-PSMA-617 (Lu-PSMA Kontrolle) oder beiden Radionukliden (Lu-PSMA + FLT), gemessen im [18 F]-Kanal.....	136
Abbildung 47: Darstellung der zellulären Zählrate in A cpm/Zelle B cpm/Well 48h nach Exposition der PC3-Zellen mit entweder [18 F]FLT (FLT Kontrolle) oder [177 Lu]Lu-X-Komplex (Lu-X-Komplex Kontrolle) oder beiden Radionukliden (Lu-X-Komplex + FLT), gemessen im [18 F]-Kanal.....	137
Abbildung 48: Ergebnis der Durchflusszytometrie der ungelabelten LNCaP-Zellen.....	138
Abbildung 49: Ergebnis der Durchflusszytometrie der Kontrollgruppe 1 der LNCaP-Zellen	138
Abbildung 50: Ergebnis der Durchflusszytometrie der mit 1 MBq/2 ml exponierten LNCaP-Zellen, Probe 1	138
Abbildung 51: Ergebnis der Durchflusszytometrie der ungelabelten PC3-Zellen.....	139
Abbildung 52: Ergebnis der Durchflusszytometrie der Kontrollgruppe 3 der PC3-Zellen ...	139
Abbildung 53: Ergebnis der Durchflusszytometrie der mit 1 MBq/2 ml exponierten PC3-Zellen, Probe 1	139
Abbildung 54 Transversalschnitt aus der Fusion von CT und SPECT von Patient 1 mit Weichteilmetastase im kleinen Becken	140
Abbildung 55 Darstellung des Disintegrations-Rechner mit Fit der Aktivitäts-Zeit-Kurve für Patient 1	140
Abbildung 56 Transversalschnitt aus der Fusion von CT und SPECT von Patient 2 mit ossärer Metastase	141
Abbildung 57 Darstellung des Disintegrations-Rechner mit Fit der Aktivitäts-Zeit-Kurve für Patient 2	141

10.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelluläre S-Werte für [¹⁷⁷ Lu]Lutetium aus (Tajik-Mansoury, 2016, Chan et al., 2017, Bardiès und Chatal, 1994) im Vergleich; ¹ : Rc target: 5 µm; ² : Zell-Zell Abstand 50µm; 3: Zell-Zell Abstand 100µm.....	23
Tabelle 2: Zelluläre S-Werte aus (Salim und Taherparvar, 2019).....	23
Tabelle 3: Zelluläre S-Werte Kegelstumpf aus (Tamborino et al., 2020).....	23
Tabelle 4 Kulturmedium und Zusätze.....	35
Tabelle 5 Potentiell zytotoxische Substanzen und Radiopharmaka.....	35
Tabelle 6 Stabilisatoren für die [¹⁷⁷ Lu]LuPSMA-617-Synthese.....	36
Tabelle 7: Darstellung der Probenzusammensetzung der wässrigen Lutetium-II-Chlorid-Lösung.....	38
Tabelle 8 Reagenzien.....	39
Tabelle 9 Gebrauchsmaterialien.....	40
Tabelle 10 Geräte.....	41
Tabelle 11 Software.....	41
Tabelle 12 Posttherapeutische Aufnahmeparameter der Patientenstudien.....	42
Tabelle 13 Probenzusammensetzung zur Vitalitätsbestimmung mittels [¹⁸ F]FLT.....	49
Tabelle 14 Zellkernflächendichte im Prostatagewebe aus (Chatterjee et al., 2015).....	53
Tabelle 15: Zelldurchmesser in Abhängigkeit des Zelltyps aus (Park et al., 2014).....	53
Tabelle 16: Makroskopische S-Werte einer Kugelsphäre für [¹⁷⁷ Lu]Lutetium aus dem OLINDA-Programm.....	54
Tabelle 17: Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten der LNCaP-Zellen in Phase I und II nach Exposition mit [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617 oder dem [¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex in Zellzahl/24 h.....	70
Tabelle 18 Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten der PC3-Zellen in Phase I und II nach Exposition mit [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617 oder dem [¹⁷⁷ Lu]Lu-X-Komplex in Zellzahl/24 h.....	72
Tabelle 19: Zelluläre Gesamtdosis extrapoliert auf 72 h unter Verwendung unterschiedlicher S-Werte (C←Cs) + (C←C) + (N←Cs) + (N←C) + (C←C'); Die Standardabweichung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Sie beträgt im Mittel 25 %.....	76
Tabelle 20: Aktivitätskonzentration intrazellulär und im Zellkulturmedium nach Exposition der LNCaP-Zellen mit 0,5 MBq/2 ml [¹⁷⁷ Lu]LuPSMA-617.....	76
Tabelle 21: Dosisbeitrag pro Zelle durch [¹⁷⁷ Lu]Lutetium-haltiges Zellkulturmedium.....	77
Tabelle 22: Relevante Daten der Weichteilmetastase von Patient 1 zum Aufnahmezeitpunkt 2 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Injektion.....	78
Tabelle 23 Maßzahlen zur Berechnung der Gesamtdosis in der Weichteilmetastase von Patient 1.....	79
Tabelle 24: Relevante Daten der Knochenmetastase von Patient 2 zum Aufnahmezeitpunkt 2 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Injektion.....	79
Tabelle 25: Maßzahlen zur Berechnung der Gesamtdosis in der Metastase von Patient 2.....	80
Tabelle 26: Darstellung der auf Basis der in-vitro-Versuchen berechneten kumulierten Aktivität in einer Metastase mit 12 ml oder 6 ml Volumen in Abhängigkeit der Zellart, der Gewebestruktur und der Inkubationsaktivitäten, CTC: im Blut zirkulierende Tumorzellen; Die Standardabweichung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Sie beträgt im Mittel 25 %.....	81
Tabelle 27: Darstellung der auf Basis der in-vitro-Versuchen berechneten Dosis in einer Metastase mit 12 ml oder 6 ml Volumen in Abhängigkeit der Zellart, der Gewebestruktur und der Inkubationsaktivitäten, CTC: im Blut zirkulierende Tumorzellen; Die	

Standardabweichung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Sie beträgt im Mittel 25 %.....	82
Tabelle 28: Übersicht der Ergebnisse; ↓: verringertes Zellüberleben; ↔: keine Wirkung; *: Veränderung des Zellzyklus nachweisbar; leeres Feld: keine Messung vorhanden; die hypothetische kumulierte Aktivität (ι) und Dosis (κ) ist exemplarische für die Metastasen von Patient 1 (Weichteilmetastase, Volumen 12 ml, applizierte Aktivität 3592 MBq) dargestellt. Die Standardabweichung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Sie beträgt im Mittel 25 %; die griechischen Buchstabenstellen den Bezug zu Abbildung 6 her	84
Tabelle 29: Übersicht der Ergebnisse; ↓: verringertes Zellüberleben; ↔: keine Wirkung; *: Veränderung des Zellzyklus nachweisbar; leeres Feld: keine Messung vorhanden; die hypothetische kumulierte Aktivität (ι) und Dosis (κ) ist exemplarische für die Metastasen von Patient 2 (Knochenmetastase, Volumen 6 ml, applizierte Aktivität 6063 MBq) dargestellt. Die Standardabweichung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Sie beträgt im Mittel 25 %; die griechischen Buchstabenstellen den Bezug zu Abbildung 6 her	85

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
CDK	Cycline Dependent Kinases
CgA	Chromogranin A
cpm	Counts per minute
CRPC	Kastrationsresistentes Prostatakarzinom
CT	Computertomographie
CTC	circulating tumor cells
DMSO	Mimethyl Sulfoxide
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FKS	Fetales Kälberserum
FOLH1	Folathydrolase I
FSC	Forward Scatter
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HDR	High dose rate
LNCaP	Lymph Node Carcinoma ft he Prostate
MIRD	Medical Internal Radiation Dose
MnSOD	Manganese superoxide dismutase
MRT	Magnetresonanztomographie
NAALADase I	N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamatpeptidase I
PAP	Prostatic Acid Phosphatase
PCa	Prostatakarzinom
PSA	Prostataspezifisches Antigen
PSMA	Prostataspezifisches Membranantigen
RLT	Radioligandentherapie
ROI	Region of Interest
SCNC	small cell neuroendocrine carcinoma
SNMMI	Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging
SPECT	Single Photon Emission Computet Tomography
SSC	Side Scatter
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
VOI	Volume of Interest

10.4 Vorversuche

10.4.1 Methoden

10.4.1.1 Zytotoxizität der Matrix des [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-Radiopharmakons

Nach Herstellung einer Suspension aus 500 µl Matrix und 10 ml Zellkulturmedium⁷ erfolgte die Inkubation der Zellen mit 200 µl dieser Suspension auf 2 ml Zellkulturmedium/Well über einen Zeitraum von maximal 24 h. Proben, welche erst nach Ablauf der maximalen Inkubationszeit von 24 h aufgearbeitet wurden, erhielten zusätzlich einen Wechsel des Zellkulturmediums zum Versuchszeitpunkt 24 h. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden abschließend mittels Trypsins geerntet und gezählt.

10.4.1.2 Zytotoxizität wässriger Lutetium-III-Chlorid-Lösung

Um eine potentielle chemische Toxizität des [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex zu untersuchen, wurden die LNCaP- und PC3-Zellen 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Lutetium-III-Chlorid, welches durch das natürlich vorkommende Isotopengemisch aus 97,4 % [¹⁷⁵Lu]Lutetium und 2,6 % [¹⁷⁶Lu]Lutetium charakterisiert ist, inkubiert und nach weiteren 24 h die Zellzahl bestimmt. Hierfür wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen nicht-radioaktiven Lutetium-III-Chlorids für 48 h inkubiert (Tabelle 7). Die Aufarbeitung erfolgte wie in Abschnitt 4.2.6 beschrieben.

⁷ Dies entspricht der in den Aufnahmeversuchen (Abschnitt 4.2.6) maximalen angesetzten Konzentration an Radiopharmakon.

10.4.1.3 Methodenkontrolle der Durchflusszytometrie mittels Staurosporin zur

Evaluation einsetzender Apoptose

Um die Ergebnisse der FACS-Analysen zum Apoptosemarker 7AAD bewerten zu können, wurde zusätzlich eine Positivkontrolle mit Staurosporin untersucht. Staurosporin ist ein nicht-selektiver Protein Kinase Inhibitor und als potentes apoptoseinduzierendes Argens bekannt (Malsy et al., 2019).

Staurosporin wurde in Zellkulturmedium zu den Konzentrationen 0,5 $\mu\text{mol/ml}$ und 5 $\mu\text{mol/ml}$ verdünnt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde der Überstand abgenommen und den mittels Trypsins geernteten Zellen zugegeben. Die darauffolgenden Waschschrirte, Fixierung und Auswertung erfolgten analog zum FACS nach den Aufnahme-Versuchen wie in Abschnitt 4.2.6 beschrieben. Die Proben wurden direkt nach Entfernung des Staurosporins sowie 24 h nach seiner Entfernung aufgearbeitet

10.4.2 Ergebnisse

10.4.2.1 Charakterisierung der nativen Zelllinien

LNCaP

Die Zelllinie LNCaP ist eine adhärenz in Monolayern wachsende Adenokarzinomzelllinie. Bei geringer Konfluenz bilden die kugligen Zellen einzelne Cytopodien mit einer maximalen Länge, die in etwa ihrer doppelten Zellkorpuslänge entspricht aus. Wird eine geringe Anzahl an Zellen ausgesät, wodurch die einzelnen Zellen über ihre Cytopodien keinen direkten Kontakt zu einander haben, sind diese in ihrem Wachstum gehemmt. Mit zunehmender Konfluenz bilden LNCaP-Zellen eine netzartige Struktur aus, wobei eine Zelle durch Bildung von 3-5 Cytopodien Kontakt zu ihren Nachbarzellen aufnimmt (Abbildung 28). Steigt die Konfluenz auf Werte größer 80 %, bilden sich Zellaggregate.

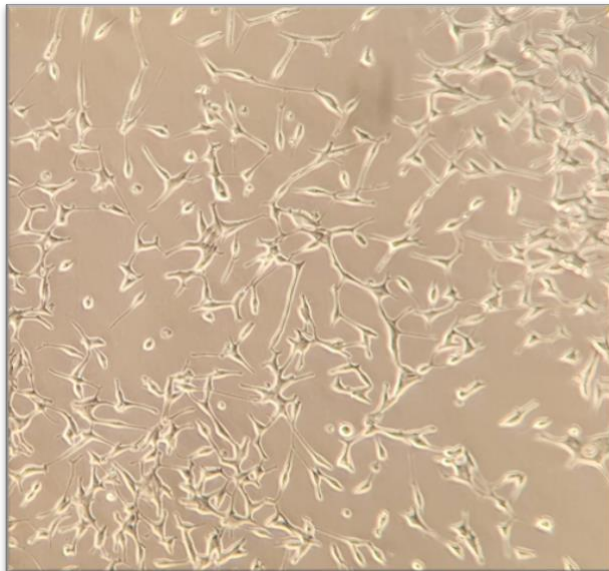


Abbildung 28 Zelllinie LNCaP in 100-facher Vergrößerung mit einer Konfluenz von ca. 50%

Die Verdopplungszeit in den eigenen Versuchen mit FKS-haltigem Zellkulturmedium betrug in der logarithmischen Phase circa 48 h. Unter FKS-Entzug verringert sich die Wachstumsgeschwindigkeit in der logarithmischen Phase. Die stationäre Phase wird circa 24 h früher bei einer um circa 50 % niedrigeren Zellzahl erreicht (Abbildung 29). Auf der Basis dieser Beobachtungen erfolgten alle weiteren Experimente mit FKS-haltigem Zellkulturmedium. Aufgrund der Verdopplungszeit von 48 h wurde der Beobachtungszeitraum in den Aufnahme-Versuchen mit [^{177}Lu]Lu-PSMA und dem [^{177}Lu]Lu-X-Komplex auf mindestens 48 h festgelegt.

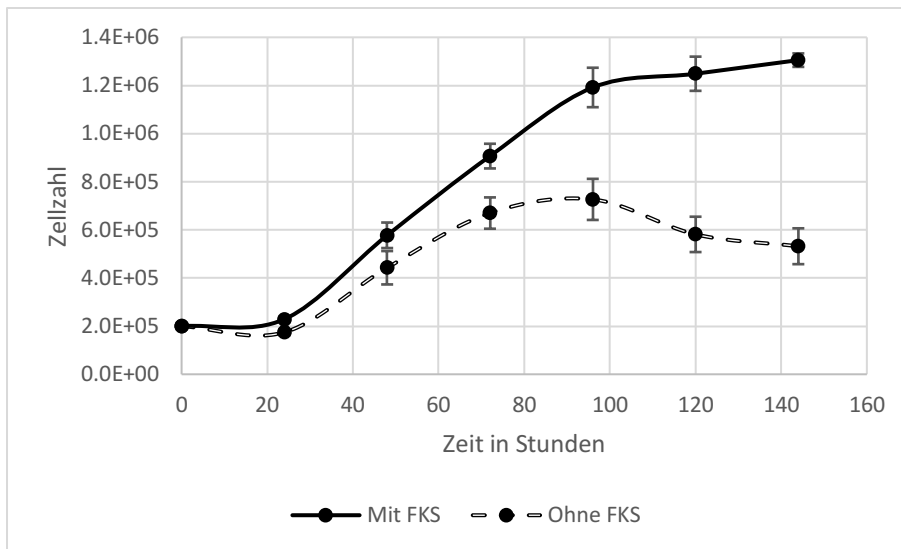


Abbildung 29 Wachstumskurve der Zelllinie LNCaP mit FKS-haltigem und -freien Medium über 144 h

PC3

Die PC3-Zellen wachsen einlagig adhärent. Bei geringer Konfluenz wirken sie kugelig verklumpt. Mit steigender Konfluenz erscheinen sie spindelförmig und bilden zunehmend Cytopodien aus. Nimmt die Konfluenz weiter zu, verkürzen sich die Cytopodien, um Platz für die zunehmenden Anzahl an Zellen zu gewähren. Lichtmikroskopisch sind bereits bei Aussat kleine Granula im Zellinneren zu erkennen, welche mit steigender Konfluenz zunehmen (Abbildung 30).

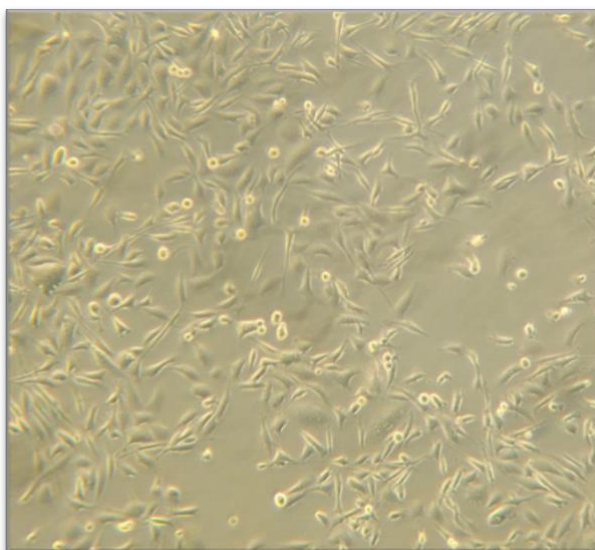


Abbildung 30: Zelllinie PC3 in 100-facher Vergrößerung bei einer Konfluenz von circa 80%

Die Verdopplungszeit in den eigenen Versuchen mit FKS-haltigem Zellkulturmedium wurde in der logarithmischen Phase mit circa 30 h bestimmt. Unter FKS-Entzug stagnierte das Zellwachstum um den Ausgangswert (Abbildung 31). Dies verdeutlicht die Abhängigkeit des Zellwachstums von den im FKS enthaltenen Wachstumsfaktoren. Um das physiologische Zellwachstum und dessen Veränderungen durch die Bestrahlung beobachten zu können, erfolgten die Zellversuche, auf Basis dieser Beobachtung mit FKS-haltigem Zellkulturmedium.

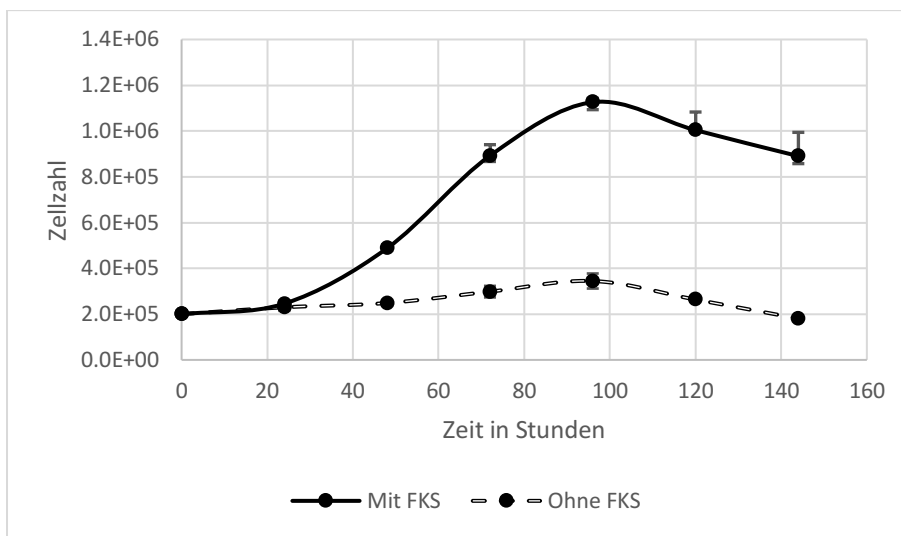


Abbildung 31: Wachstumskurve der Zelllinie PC3 mit FKS-haltigem und -freien Medium über 144 h

10.4.2.2 Bestimmung der Zellgröße

Nach Normierung des Messokulars anhand einer Zählkammer nach Neubauer wurde die Größe einer LNCaP- und PC3-Zelle mit durchschnittlich 15 μm in der Länge und 50 μm in der Breite geschätzt (Abbildung 32).

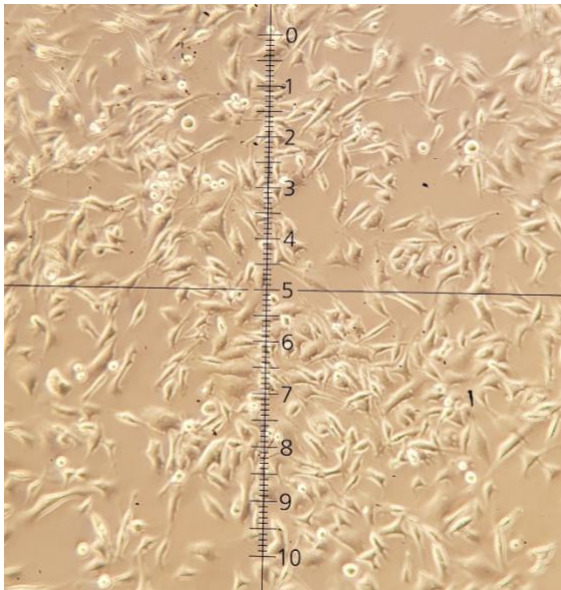


Abbildung 32: Darstellung der LNCaP-Zellen durch das Messokular

10.4.2.3 Toxizität der Matrix des $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-Radiopharmakons}$

In diesem Versuch wurde der Einfluss der reinen Matrix des $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-Radiopharmakons}$ (ohne $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ und PSMA) auf das Zellüberleben der PC3-Zellen untersucht. Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 48 h konnte keine signifikante Zu- oder Abnahme der Zellzahl durch Einfluss der Matrix im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Abbildung 33).

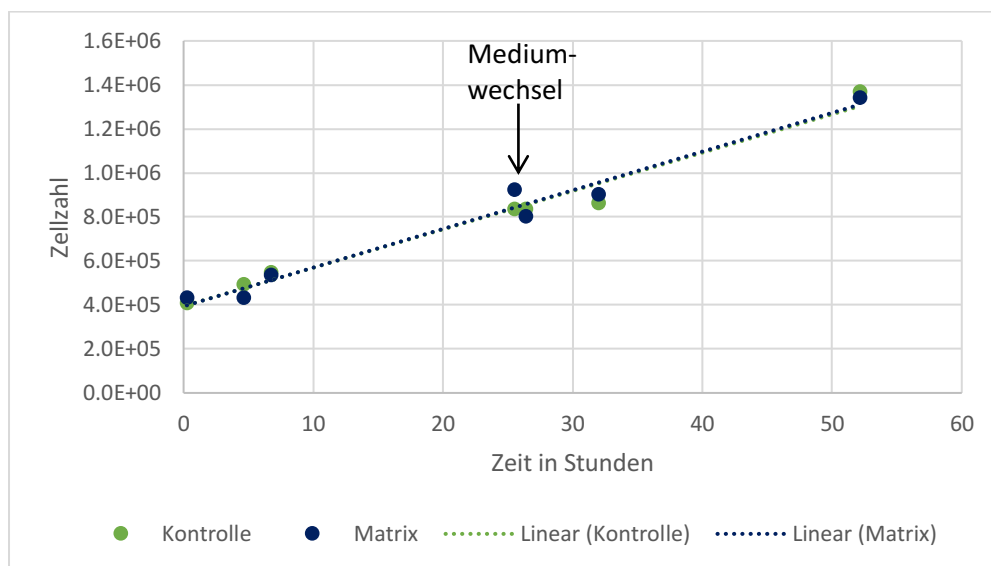


Abbildung 33: Zellzahlen der PC3-Zellen über 48 h nach Inkubation mit der Matrix des $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-Radiopharmakons}$

10.4.2.4 Zytotoxizität wässriger Lutetium-III-Chlorid-Lösung

Ziel dieses Versuchs war es, die Ursache der Zellzahlveränderungen beider Zelllinien durch Exposition mit dem $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$ genauer zu untersuchen. Es stellte sich die Frage, ob die Zellzahlveränderungen entweder durch die Wirkung der ionisierenden Strahlung des $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ oder durch die potentiell zytotoxischen Eigenschaften des $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$, welcher mutmaßlich in einer ähnlichen chemischen Form zu einem gelösten LuCl_3 -Salz vorliegt, verursacht wurden.

48 h nach Inkubationsbeginn konnte in keiner Gruppe eine signifikante Zu- oder Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 34, Abbildung 35). Dies zeigte sich unabhängig von der Zelllinie und der Konzentration des eingesetzten LuCl_3 . Die Ergebnisse zeigen, dass selbst bei deutlich höheren Konzentrationen an LuCl_3 (2,5nmol/ml)

als sie im Radiopharmakon zu erwarten sind ($1,5 \times 10^{-3}$ nmol/ml), keine signifikanten Veränderungen des Zellwachstums vorliegen.

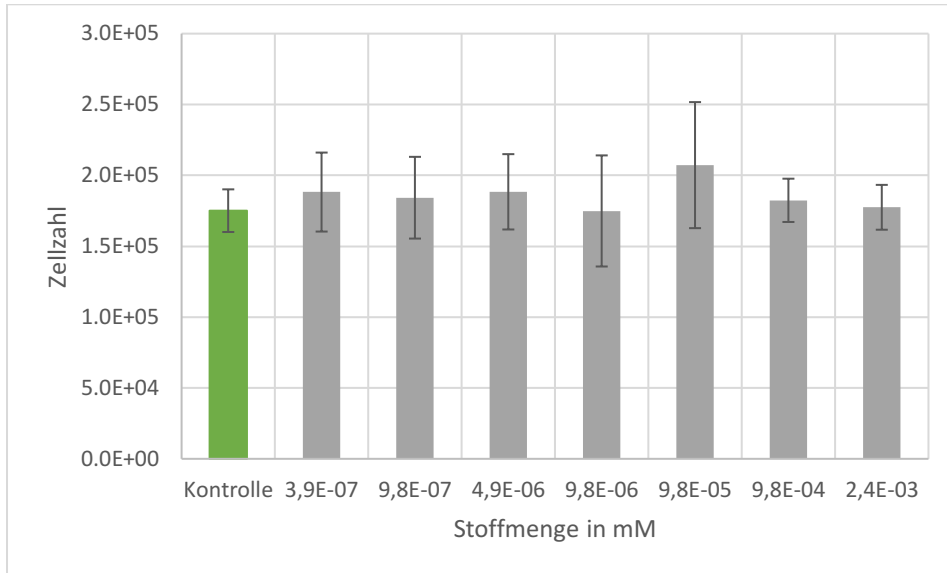


Abbildung 34 Zellzahlen der LNCaP-Zellen 24 h nach 24-stündiger LuCl_3 -Exposition

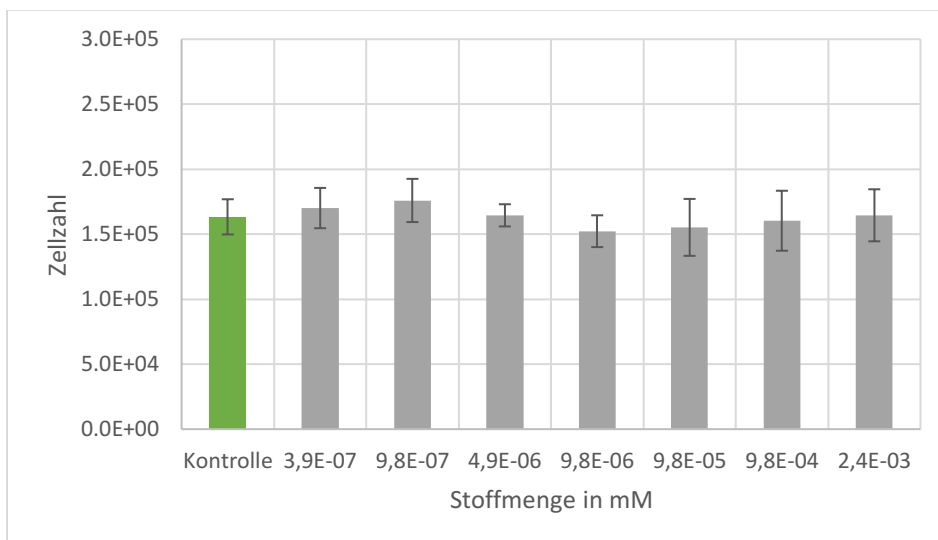


Abbildung 35 Zellzahlen der PC3-Zellen 24 h nach 24-stündiger LuCl_3 -Exposition

10.4.2.5 Aufnahmekinetik von [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA I&T in die LNCaP-Zellen

Vergleichend zu den Untersuchungen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 erfolgte die Inkubation der LNCaP-Zellen mit 0,09 MBq/2 ml bis 10 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-I&T über einen Zeitraum von 24 h. Bei Inkubation der LNCaP-Zellen mit einer Aktivitätskonzentration von 0,09 MBq/2 ml bis 1,25 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-I&T zeigte sich ein exponentieller Anstieg der zellulären Zählrate, welcher sich anschließend bei Steigerung der Aktivitätskonzentration auf bis zu 10 MBq/2 ml einer maximalen zellulären Zählrate von circa 2×10^{-1} cpm/Zelle ($SD \pm 3 \times 10^{-2}$) annäherte (Abbildung 36).

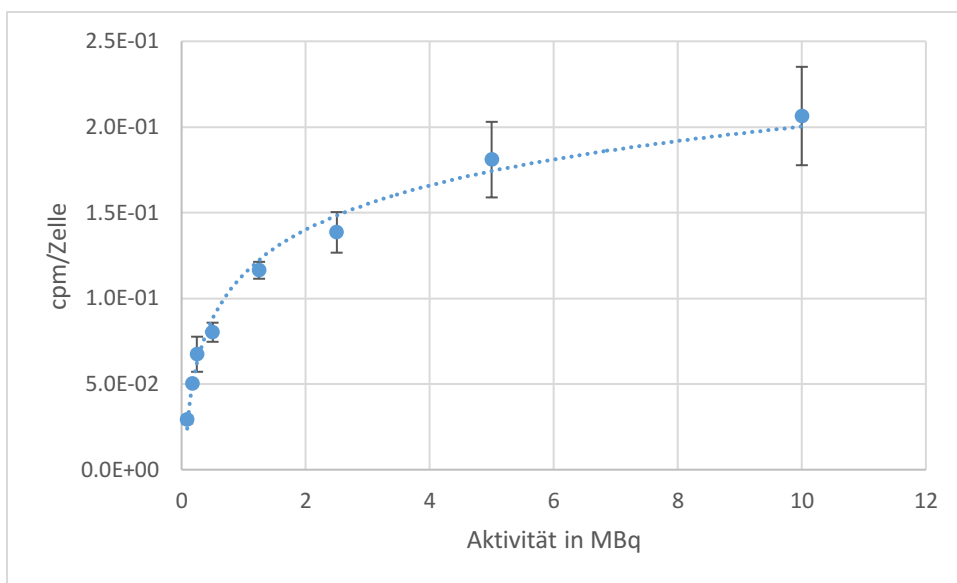


Abbildung 36: Gemessene Zählrate je LNCaP-Zelle nach Exposition mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA I&T in Abhängigkeit der Aktivitätskonzentration

10.4.2.6 Zellüberleben der LNCaP-Zellen nach Inkubation mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA I&T

24 h nach Exposition der LNCaP-Zellen mit ansteigenden Aktivitätskonzentrationen an [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-I&T zeigte sich eine von der Aktivitätskonzentration abhängige Abnahme der Zellzahl. Bei einer Aktivitätskonzentration von 0,09 MBq/2 ml bis 1,25 MBq/2 ml stellte sich ein nahezu linearer Abfall der Zellzahl heraus (Abbildung 37).

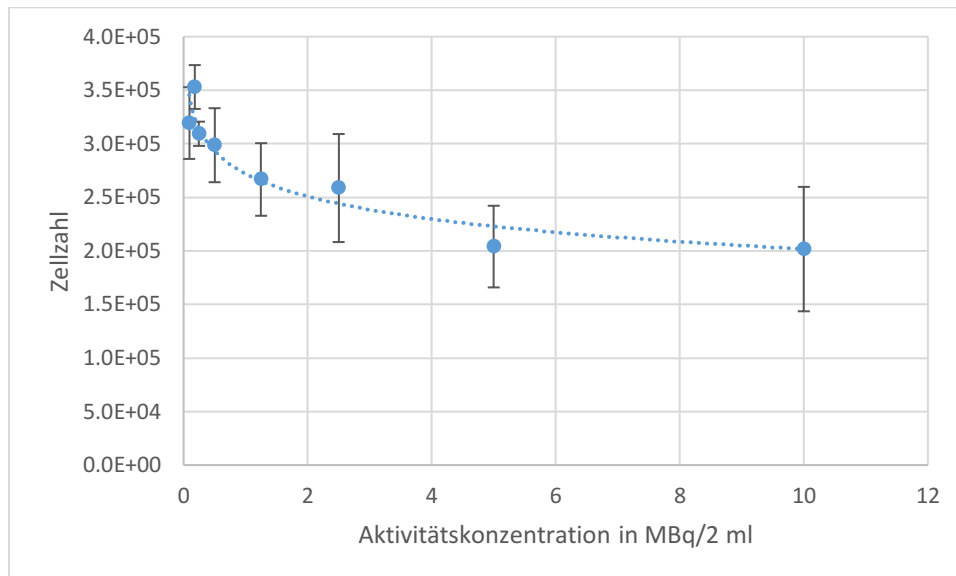


Abbildung 37 Zahl der LNCaP-Zellen 24 h nach Inkubation mit [¹⁷⁷Lu]LuPSMA-I&T mit einer Aktivitätskonzentration von 0,09-10 MBq/2 ml

10.4.2.7 Methodenkontrolle der Durchflusszytometrie mittels Staurosporin zur

Evaluation einsetzender Apoptose

Staurosporin induziert als nicht-selektiver Protein Kinase Inhibitor über unterschiedliche Wege Apoptose (Belmokhtar, Hillion und Ségal-Bendirdjian, 2001). Daher wurde eine Exposition mit Staurosporin als Positivkontrolle zu den 7AAD-FACS-Untersuchungen gewählt.

Exposition der LNCaP-Zellen mit Staurosporin: Die Kontrollgruppe war durch 1 % (SD ±1 %) der Zellen in der Sub-G1-Fraktion, 52 % (SD ±1 %) in der G1-Phase, 31 % (SD ±1 %) in der S-Phase, 15 % (SD ±1 %) in der G2-Phase, sowie 1 % (SD ±1 %) in der >G2-Fraktion charakterisiert.

Sowohl 24 h als auch 48 h nach Zugabe von 2,5 µM Staurosporin nahm die M1-Fraktion im Vergleich zur Kontrollgruppe zu. Die Zellenzahlen in der G1- und in der G2-Phase nahmen korrespondierend dazu ab. Die Anzahl der Zellen in der S-Phase hingegen nahmen zu. Der

Anteil der Zellen mit einem Chromosomensatz größer als jener in der G2-Phase nahm in beiden Gruppen ab (Abbildung 38).

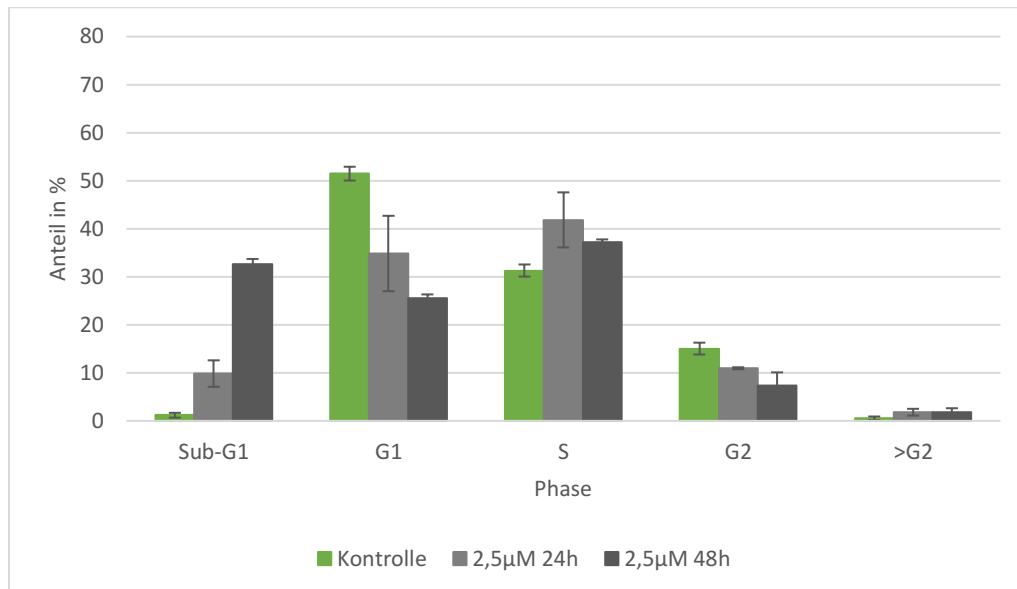


Abbildung 38: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen der LNCaP-Zellen 24 h und 48 h nach Exposition mit 2,5 μM Staurosporin

Bei Erhöhung des Staurosporin-Gehalts auf 25 μM stieg der Anteil an LNCaP-Zellen in der Sub-G1-Fraktion an (Abbildung 39). Die Anzahl der Zellen in der G1- und G2-Phase nahm korrespondierend dazu, wie bei der Inkubation mit 2,5 μM Staurosporin, ab. Der Anteil der LNCaP-Zellen in der S-Phase nahm nach einer Inkubationszeit von 24 h geringfügig zu. Bei Verlängerung der Inkubationszeit nahm dieser hingegen wieder ab. Der Anteil der LNCaP-Zellen mit einem Chromosomensatz größer als jener in der G2-Phase nahm auf 5 % (SD ±2 %) nach 24 h zu und verringerte sich bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 1 % (SD ±1 %).

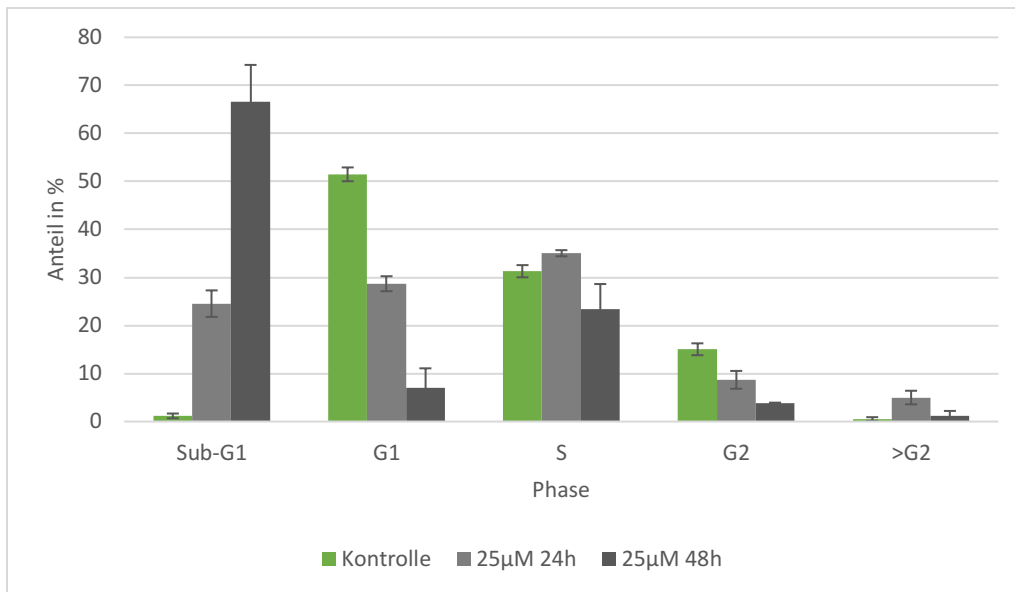


Abbildung 39: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen der LNCaP-Zellen 24 h und 48 h nach Exposition mit 25 μM Staurosporin

Exposition der PC3-Zellen mit Staurosporin: Die Kontrollgruppe der PC3-Zellen war durch 1 % (SD ± 1 %) der Zellen in der Sub-G1-Phase, 50 % (SD ± 4 %) in der G1-Phase, 25 % (SD ± 3 %) in der S-Phase, 22 % (SD ± 2 %) in der G2-Phase, sowie 1 % (SD ± 0 %) in der >G2-Fraktion charakterisiert.

Nach Exposition der PC3-Zellen mit 2,5 μM Staurosporin zeigte sich eine Zunahme der Zellen in der Sub-G1-Fraktion. Der Anteil der Zellen in der G1-Phase lag signifikant unter dem der Kontrollgruppe. Der Anteil der Zellen in der S-Phase nahm ebenfalls ab. Korrespondierend dazu vergrößerte sich der Anteil der sich in der G2-Phase befindenden Zellen. Der Anteil der PC3-Zellen mit einem Chromosomensatz größer als jener in der G2-Phase nahm auf 4 % (SD ± 1 %) unabhängig von der Inkubationszeit zu (Abbildung 40).

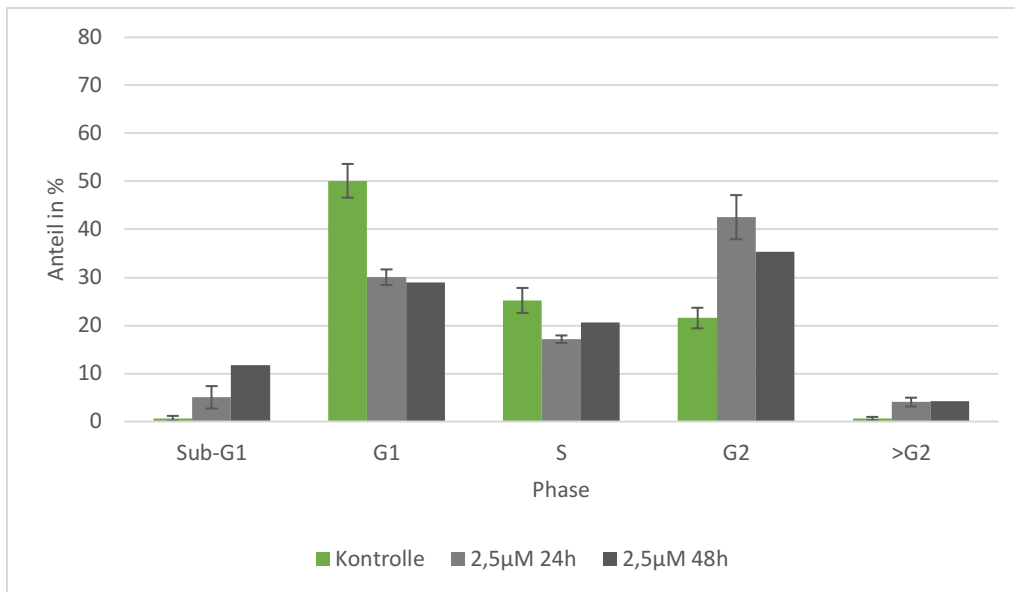


Abbildung 40: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen der PC3-Zellen 24 h und 48 h nach Exposition mit 2,5 μM Staurosporin

Bei Erhöhung des Staurosporin-Gehalts auf 25 μM nahm der Anteil an PC3-Zellen in der Sub-G1-Phase zu (Abbildung 41). Analog zur Inkubation mit 2,5 μM Staurosporin nahm der Anteil der Zellen in der G1-Phase ab. Der Anteil der Zellen in der S-Phase blieb sowohl nach einer 24-stündigen Inkubationszeit als auch nach einer 48-stündigen Staurosporinexposition konstant. Der Anteil der PC3-Zellen mit einem Chromosomensatz größer als jener in der G2-Phase nahm auf 3 % (SD \pm 1 %) unabhängig von der Inkubationszeit zu.

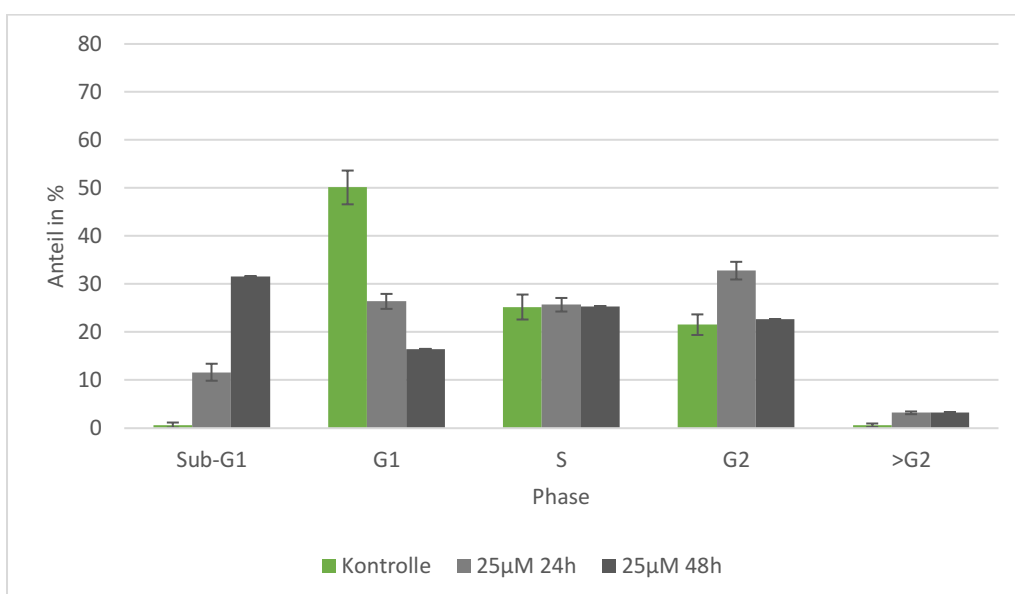


Abbildung 41: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen der PC3-Zellen 24 h und 48 h nach Exposition mit 25 μM Staurosporin

10.4.2.8 Blutpoolkonzentration

Abbildung 42 zeigt die Blutpoolkonzentration von [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 beider Patienten. Der steilste Abfall der Aktivität zeigte sich innerhalb der ersten zwei Stunden. 24 h nach Therapiebeginn waren lediglich noch 10 % der 30 min nach Therapiebeginn im Blut gemessenen Aktivität nachweisbar.

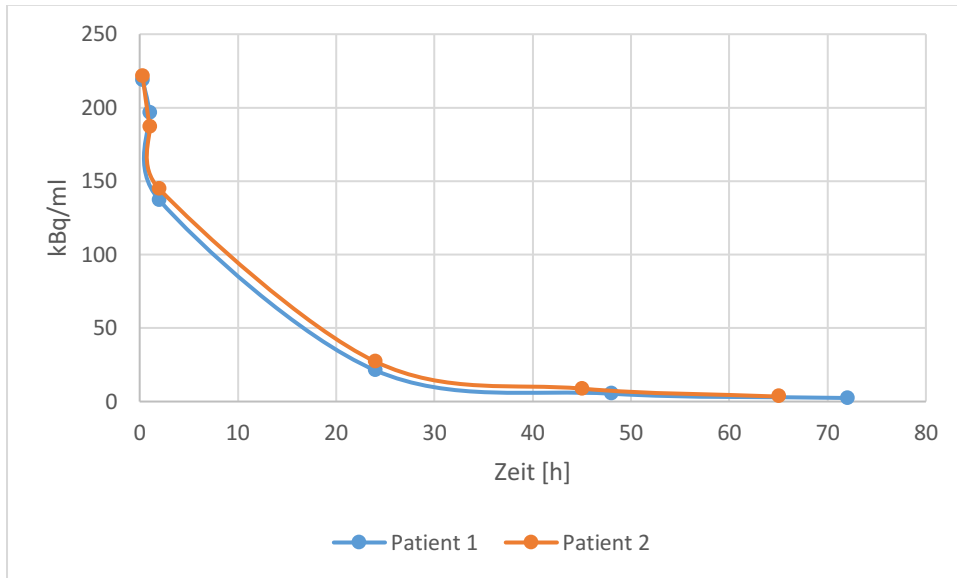


Abbildung 42: Blutpoolkonzentration [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 von Patient 1 und 2 über 72 h

10.5 Ergänzende Ergebnisse der Hauptversuche mit PC3-Zellen

10.5.1 Bindungsspezifität und Internalisierungskinetik

Inkubation der PC3-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617: Die im Folgenden dargestellte prozentuale Verteilung der zellulär gebundenen Aktivität bei Exposition der PC3-Zellen mit 1 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 beruht auf einem minimalen Uptake von 350 cpm/Well, welcher über der Zählrate der Leerwerte von 100 cpm/Well lag. Bei Exposition der PC3-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 konnte ein Anstieg der zytoplasmatischen Fraktion beobachtet werden (Abbildung 43A).

Bei Exposition der PC3-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 konnte zum Versuchszeitpunkt 2 h trotz Verringerung der Temperatur auf 4 °C eine Verdopplung der zytoplasmatischen Fraktion beobachtet werden. Bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 5 h zeigte sich diese Differenz nicht (Abbildung 43B).⁸

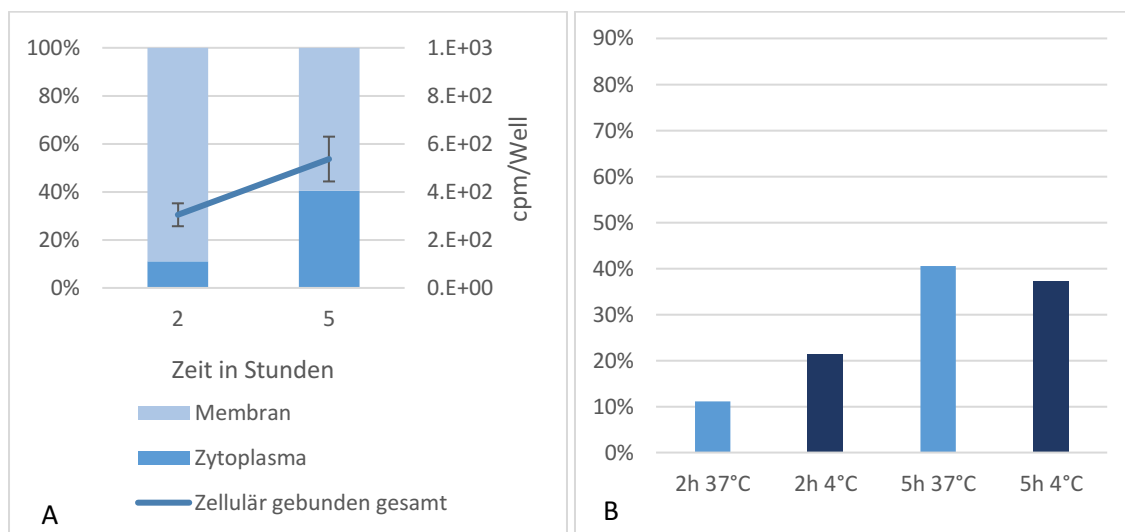


Abbildung 43: **A:** Darstellung der membrangebundenen und zytoplasmatischen Fraktion, sowie die absolute zellulär gebundenen Aktivität der PC3-Zellen nach Exposition mit [¹⁷⁷Lu]LuPSMA-617 bei 37 °C; **B:** Darstellung der zytoplasmatischen Fraktion der zellulär gebundenen Aktivität der PC3-Zellen nach Exposition mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA bei 37 °C und 4 °C

⁸ Der hier dargestellte Einfluss der Temperatur auf die Internalisierungskinetik der PC3-Zellen beruht auf einem nicht signifikantem Uptake, welcher in etwa der dreifachen der zellulären Zählrate der Leerwerte entspricht. Die Validität ist somit fraglich.

Inkubation der PC3-Zellen mit dem $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$: Die PC3-Zellen zeigten ebenfalls eine Zunahme der zytoplasmatischen Fraktion bei Verlängerung der Inkubationszeit von 2 h auf 5 h (Abbildung 44A). Die zellulär gebundene Aktivität zeigte sich unabhängig von der Inkubationszeit.

Bei Inkubation der PC3-Zellen mit dem $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$ zeigte sich durch Verringerung der Temperatur von 37 °C auf 4 °C eine Abnahme der zytoplasmatischen Fraktion der zellulär gebundenen Aktivität (Abbildung 44B).

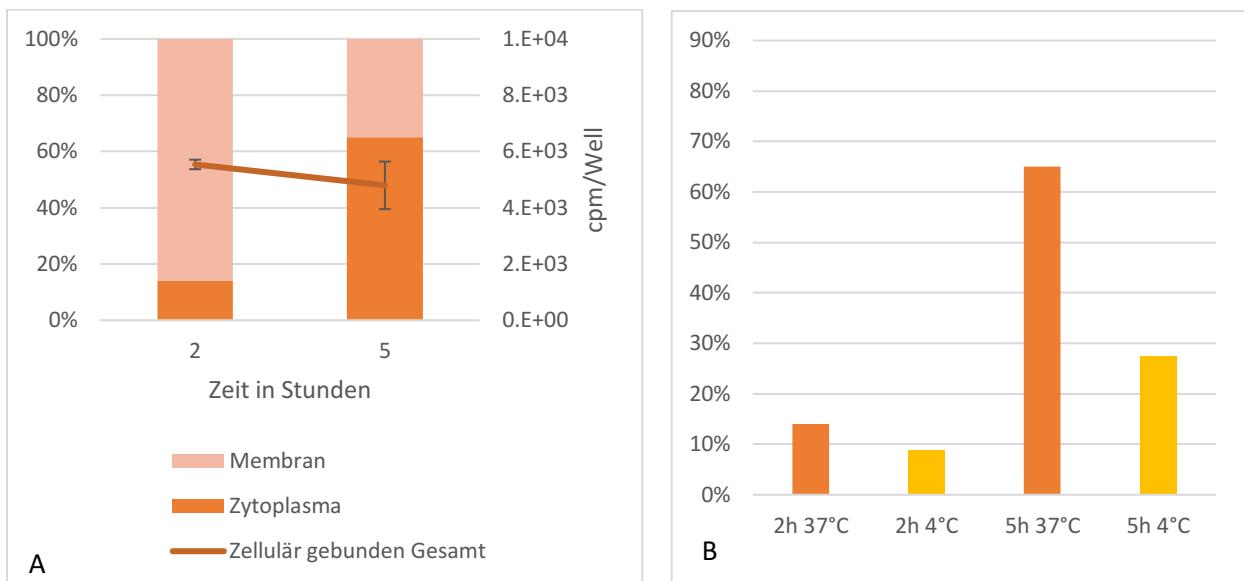


Abbildung 44: **A**: Darstellung der membrangebundenen und zytoplasmatischen Fraktion sowie die absolute zellulär gebundenen Aktivität der PC3- Zellen nach Exposition mit dem $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$ bei 37 °C; **B**: Darstellung der zytoplasmatischen Fraktion der zellulär gebundenen Aktivität der PC3-Zellen nach Exposition mit $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-X-Komplex}$ bei 37°C und 4°C

10.5.2 Durchflusszytometrie zur Evaluation einsetzender Apoptose nach Bestrahlung mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617

Exposition der PC3-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617: Die Kontrollgruppe der PC3-Zellen war durch 2 % (SD ±0 %) der Zellen in der Sub-G1-Fraktion, 24 % (SD ±1 %) in der G1-Phase, 30 % (SD ±1 %) in der S-Phase, 51% in der G2-Phase sowie 0 % (SD ±0 %) in der >G2-Fraktion gekennzeichnet.

Nach Exposition der PC3-Zellen mit 1 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 zeigte sich keine signifikante Veränderung der prozentualen Verteilung oder Zellen zwischen der sub-G1- und >G2-Fraktion sowie der S-, G1-, und G2-Phase. Der prozentuale Anteil der Zellen mit einem Chromosomensatz größer als jener in der G2-Phase blieb ebenfalls unverändert (Abbildung 45).

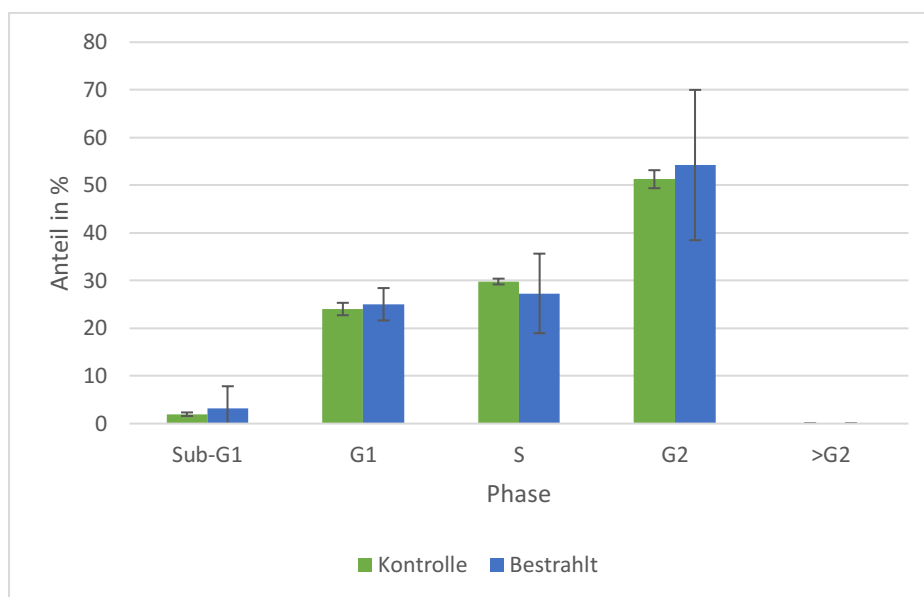


Abbildung 45 Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen der PC3-Zellen 24 h nach Exposition mit 1 MBq/2 ml [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617

10.5.3 Vitalitätsbestimmung mittels [¹⁸F]FLT

Exposition der PC3-Zellen mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617: Die Kontrollgruppe der mit [¹⁸F]FLT exponierten Zellen zeigte eine Aufnahme von $8,5 \times 10^{-1}$ cpm/Zelle (SD $\pm 7,6 \times 10^{-2}$) bzw. $1,0 \times 10^6$ cpm/Well (SD $\pm 6,9 \times 10^4$). Nach Exposition der Kontrollgruppe mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 war ein Uptake von $1,7 \times 10^{-3}$ cpm/Zelle (SD $\pm 2,0 \times 10^{-4}$) bzw. $2,0 \times 10^3$ cpm/Well (SD $\pm 3,3 \times 10^2$) zu beobachten. Die mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 und [¹⁸F]FLT exponierten Zellen zeigten eine Zählrate von $8,3 \times 10^{-1}$ cpm/Zelle (SD $\pm 4,5 \times 10^{-2}$) bzw. $1,1 \times 10^6$ cpm/Well (SD $\pm 1,1 \times 10^4$) (Abbildung 46 A, B).

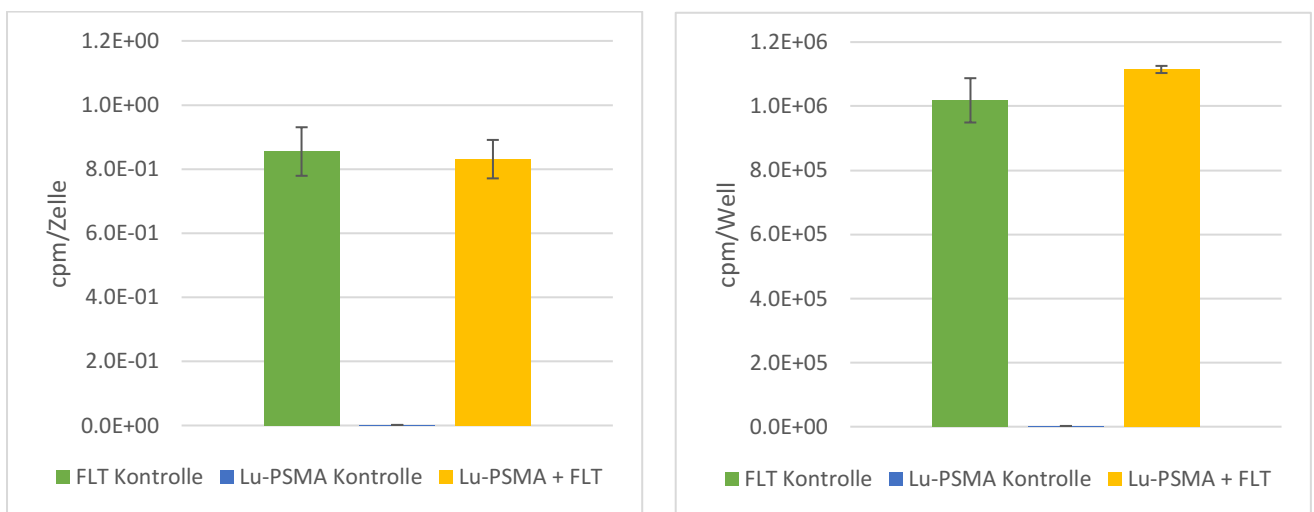


Abbildung 46: Darstellung der zellulären Zählrate in **A** cpm/Zelle **B** cpm/Well 48h nach Exposition der PC3-Zellen mit entweder [¹⁸F]FLT (FLT Kontrolle) oder [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 (Lu-PSMA Kontrolle) oder beiden Radionukliden (Lu-PSMA + FLT), gemessen im [¹⁸F]-Kanal

Exposition der PC3-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex: Die Kontrollgruppe der mit [¹⁸F]FLT exponierten Zellen zeigte eine Aufnahme von $8,5 \times 10^{-1}$ cpm/Zelle (SD $\pm 7,6 \times 10^{-2}$) bzw. $1,0 \times 10^6$ cpm/Well (SD $\pm 6,9 \times 10^4$). Die Kontrollgruppe der mit [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex exponierten Zellen erreichte eine Zählrate von $5,2 \times 10^{-3}$ (SD $\pm 4,2 \times 10^{-3}$) cpm/Zelle bzw. $5,6 \times 10^3$ cpm/Well (SD $\pm 4,7 \times 10^3$). Nach Exposition der PC3-Zellen mit dem [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex und [¹⁸F]FLT zeigte sich eine Zählrate von $8,6 \times 10^{-1}$ (SD $\pm 6,0 \times 10^{-2}$) cpm/Zelle bzw. $1,1 \times 10^6$ cpm/Well (SD $\pm 4,5 \times 10^4$) (Abbildung 47 A, B).

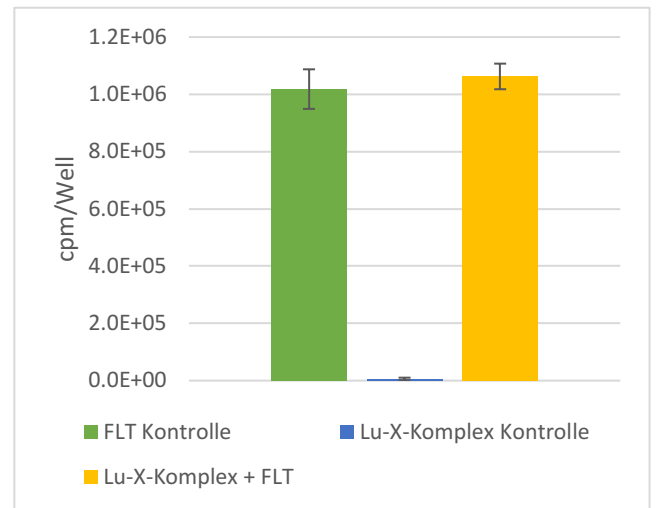
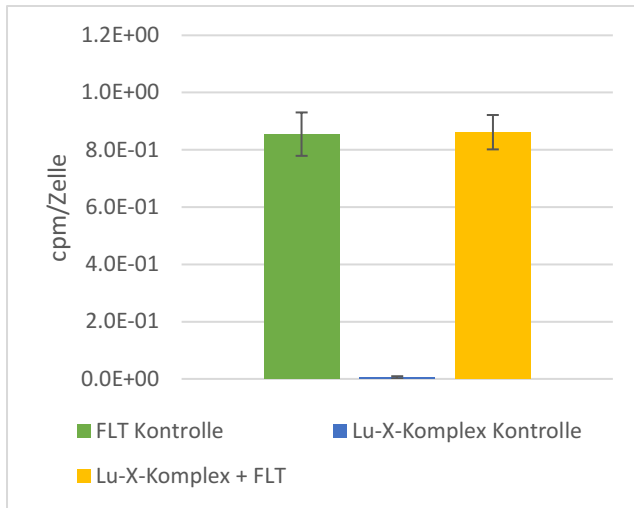


Abbildung 47: Darstellung der zellulären Zählrate in **A** cpm/Zelle **B** cpm/Well 48h nach Exposition der PC3-Zellen mit entweder [¹⁸F]FLT (FLT Kontrolle) oder [¹⁷⁷Lu]Lu-X-Komplex (Lu-X-Komplex Kontrolle) oder beiden Radionukliden (Lu-X-Komplex + FLT), gemessen im [¹⁸F]-Kanal

10.6 Ergänzende Abbildungen

10.6.1 Auswertung der Durchflusszytometrie

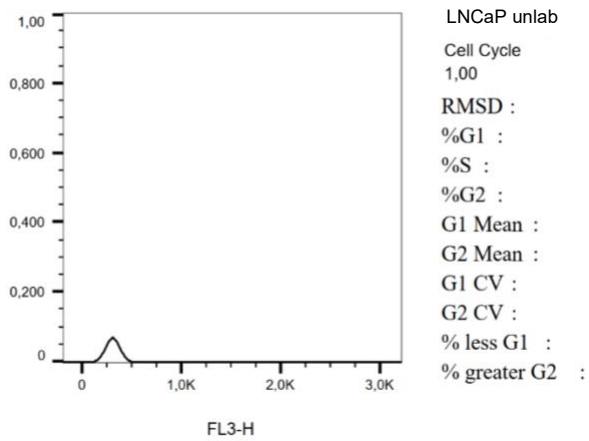


Abbildung 48: Ergebnis der Durchflusszytometrie der ungelabelten LNCaP-Zellen

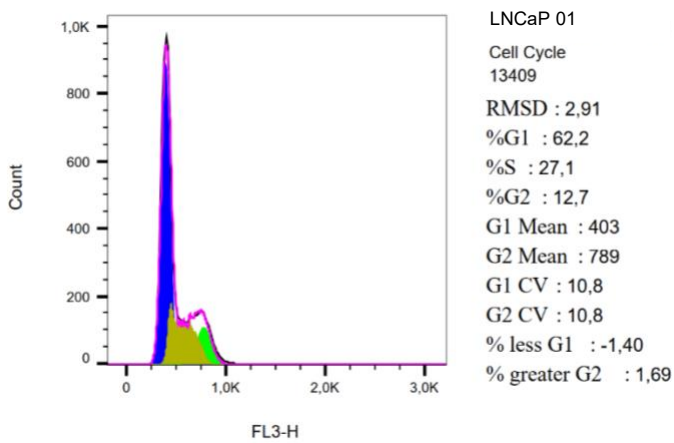


Abbildung 49: Ergebnis der Durchflusszytometrie der Kontrollgruppe 1 der LNCaP-Zellen

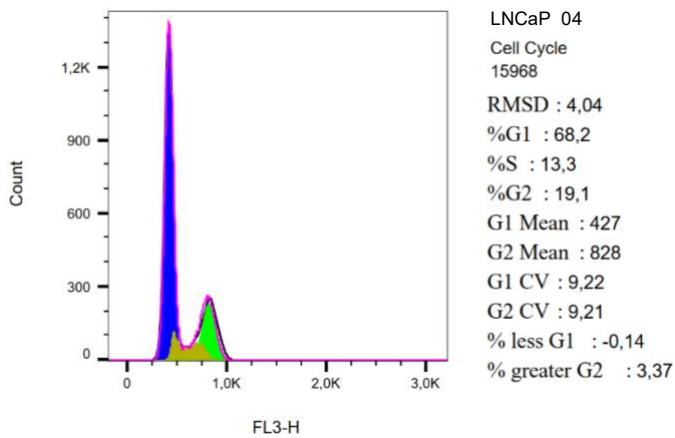


Abbildung 50: Ergebnis der Durchflusszytometrie der mit 1 MBq/2 ml exponierten LNCaP-Zellen, Probe 1

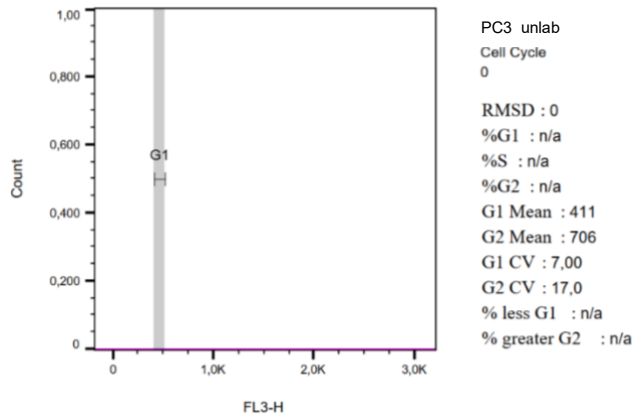


Abbildung 51: Ergebnis der Durchflusszytometrie der ungelabelten PC3-Zellen

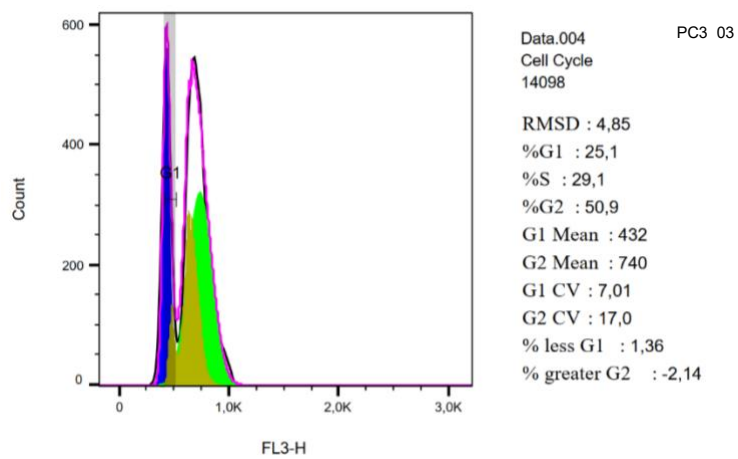


Abbildung 52: Ergebnis der Durchflusszytometrie der Kontrollgruppe 3 der PC3-Zellen

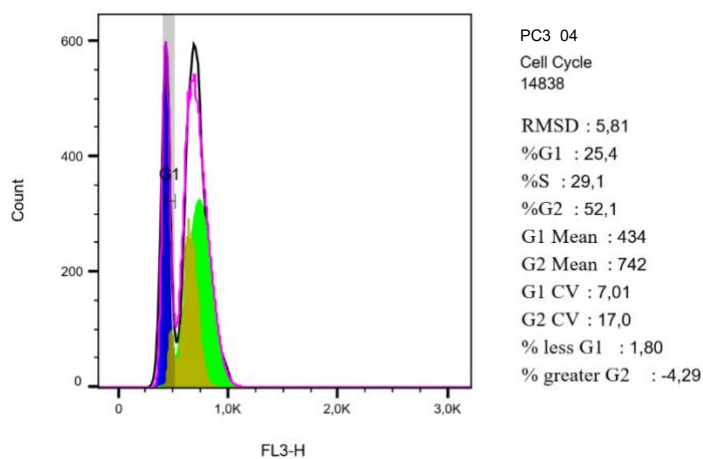


Abbildung 53: Ergebnis der Durchflusszytometrie der mit 1 MBq/2 ml exponierten PC3-Zellen, Probe 1

10.6.2 Patientenstudien



Abbildung 54 Transversalschnitt aus der Fusion von CT und SPECT von Patient 1 mit Weichteilmetastase im kleinen Becken

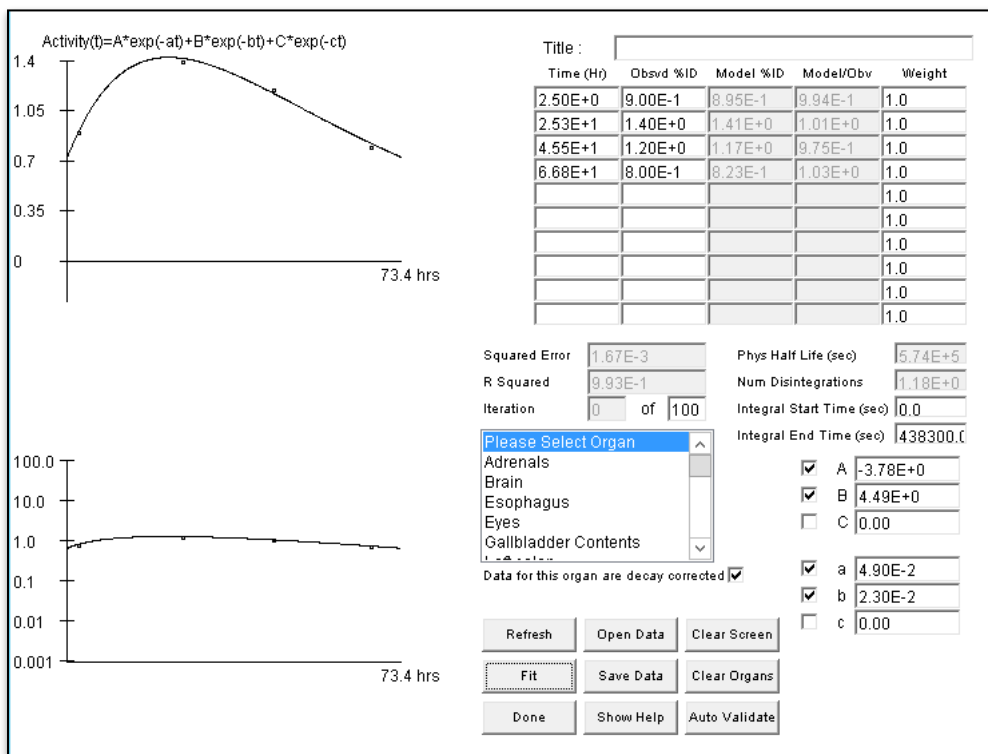


Abbildung 55 Darstellung des Disintegrations-Rechner mit Fit der Aktivitäts-Zeit-Kurve für Patient 1

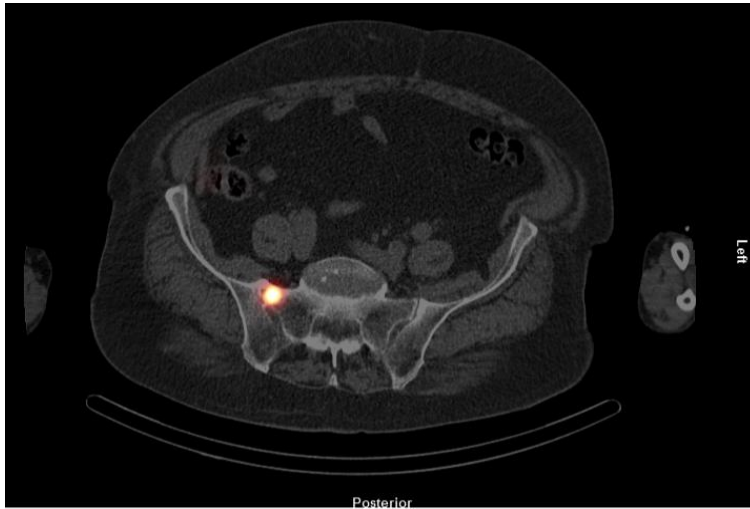


Abbildung 56 Transversalschnitt aus der Fusion von CT und SPECT von Patient 2 mit ossärer Metastase

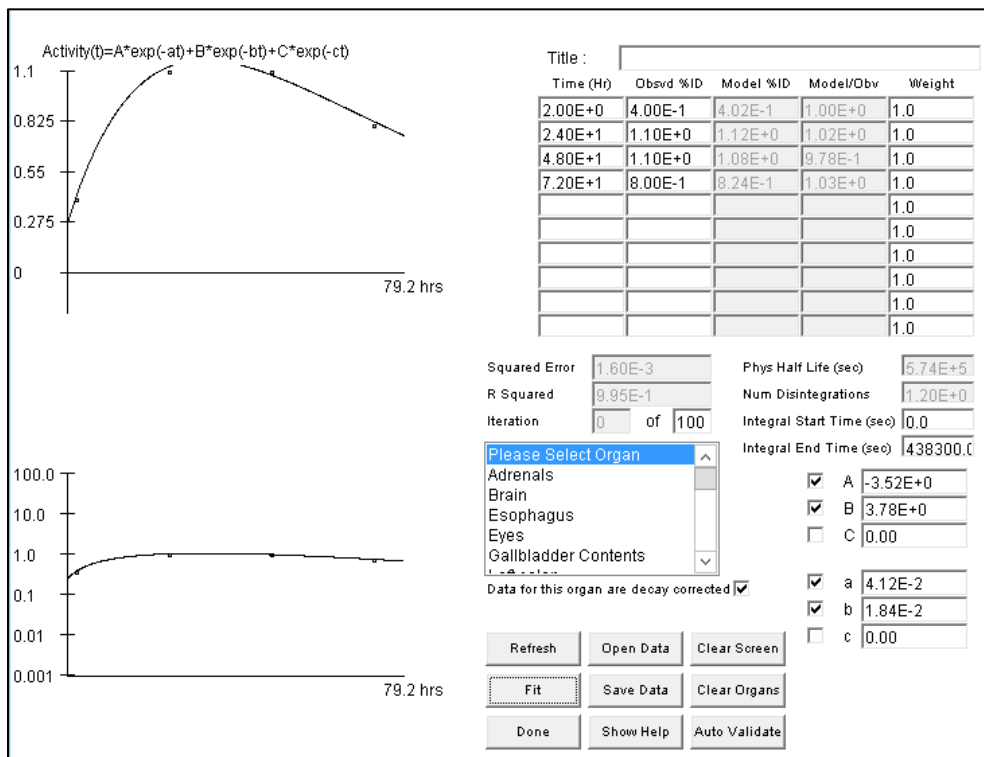


Abbildung 57 Darstellung des Disintegrations-Rechner mit Fit der Aktivitäts-Zeit-Kurve für Patient 2

10.7 Exemplarische Dosisberechnungen

Berechnung der zellulären Dosis

Zelluläre S-Werte für Lu-177				
Mansoury et al. 2016 MIRD R _c =7μm R _n =3μm	self-absorption	S-Wert (C←C)	4,72E-04 Gy/(Bq*s)	4,72E+05 mGy/(MBq*s)
	cross-absorption	S-Wert (C←Cs)	2,93E-04 Gy/(Bq*s)	2,93E+05 mGy/(MBq*s)
		S-Wert (N←Cy)	3,07E-04 Gy/(Bq*s)	3,07E+05 mGy/(MBq*s)
	S-Wert (N←Cs)	1,61E-04 Gy/(Bq*s)	1,61E+05 mGy/(MBq*s)	
Chan et al. 2017	cross dose (Cell distance 50μm)	S-Wert (C←C')		2,00E-07 mGy/(MBq*s)
	cross dose (Cell distance 100μm)	S-Wert (C←C')		4,18E-08 mGy/(MBq*s)

Bohrlochfaktor für Lu-177
1252540,8 cpm/MBq
75152448 cps/MBq

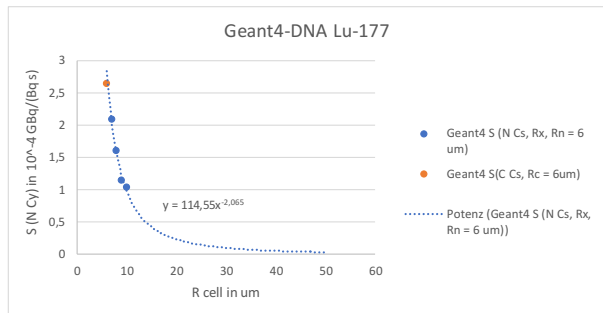
Dosisberechnung LNCaP LuPSMA 0,5MBq/2 ml

Phase I						Phase II					
Formel	$y = -9E-05x^2 + 0,0033x + 0,0289$					Formel	$y = 0,1362e^{-0,037x}$				
Variablen	a	-9,00E-05	T-Start	0 h		Variablen	c	1,36E-01	T-Start	24 h	
	b	3,30E-03	T-Ende	2 h			tau	-3,70E-02	T-Ende	72 h	
	c	2,89E-02									
			Integral (Te-Ts)	6,4E-02 cpm*h					Integral (Te-Ts)	1,3E+00 cpm*h	
						Aktivitätsverteilung	0-2h	2-5h	5-24h	24-72h	
cpm*h		6,4E-02	1,2E-01	1,0E+00	1,3E+00	Membran	1	0,42	0,16	0,16	
MBq*h		5,1E-08	9,4E-08	8,4E-07	1,0E-06	Zytoplasma	0	0,58	0,84	0,84	
Membran		5,1E-08	4,0E-08	1,3E-07	1,6E-07						
Zytoplasma		0,0E+00	5,5E-08	7,0E-07	8,4E-07						
Summe		5,1E-08	9,4E-08	8,4E-07	1,0E-06	Summe					
Zelluläre Dosis gesamt						Dosis Zellkern					
self-absorption	S-Wert (C←C)	8,7E+01	1,6E+02	1,4E+03	1,7E+03	S-Wert (N←Cy)	0,0E+00	6,0E+01	7,8E+02	9,3E+02	
cross-absorption	S-Wert (C←Cs)	5,4E+01	4,2E+01	1,4E+02	1,7E+02	S-Wert (N←Cs)	3,0E+01	2,3E+01	7,8E+01	9,3E+01	
cross dose (Cell distance 50μm)	S-Wert (C←C')	3,7E-11	6,8E-11	6,0E-10	7,2E-10	Summe	3,0E-02	8,3E-02	8,5E-01	1,0E+00	1,99 Gy
cross dose (Cell distance 100μm)	S-Wert (C←C')	7,7E-12	1,4E-11	1,3E-10	1,5E-10						
Summe		0,1	0,2	1,6	1,9						
					3,78 Gy						

Berechnung des Dosisbeitrags durch das Zellkulturmedium

MIRD aus Mansoury et al. 2016		alle S-Werte [$10^{-4} \times \text{Gy}/(\text{Bq} \times \text{s})$]		
R cell [μm]	R nucleus [μm]	S (N \leftarrow Cy)	S (N \leftarrow Cs)	S (C \leftarrow Cs)
6	6			4,15
7	6	2,63	1,95	
8	6	2,03	1,32	
9	6	1,65	0,99	
10	6	1,38	0,77	
30	6	0,02		

Geant4-DNA aus Mansoury et al. 2016		alle S-Werte [$10^{-4} \times \text{Gy}/(\text{Bq} \times \text{s})$]		
R cell [μm]	R nucleus [μm]	S (N \leftarrow Cy)	S (N \leftarrow Cs)	S (C \leftarrow Cs)
6	6			2,64
7	6	2,08	1,31	
8	6	1,59	0,783	
9	6	1,14	0,605	
10	6	1,03	0,528	
30	6	0,01	0,102032776	



Volumen Medium in Well:

2 mL = cm³

Volumen der Halbkugel mit einem Radius x um die Zelle

$V = (\pi \times r^3 \times 4/3)/2$
Vsphäre um Zelle - V Zelle
5,65487E-08 cm ³
rel. Anteil 0,00000283%

HWZ Lu-177	159,5280 h
Zerfallskonst.	0,0043 h ⁻¹
t1	24 h
t0	0 h

Aktivität im Medium des entsprechenden Areal um die Zelle

Aktivität/Well [MBq]	Aktivität/Rx [MBq]	kum. Aktivität [MBq*h]	kum. Aktivität [Bq*h]	kum. Aktivität [Bq*s]	Dosis Zelle [Gy]
0,5	1,4E-08	3,2E-07	0	1,16E+03	2,18E-03
1	2,8E-08	6,4E-07	1	2,32E+03	4,36E-03
3	8,5E-08	1,9E-06	2	6,96E+03	1,31E-02

$$\tilde{A}_{t_{\square}} = A_0 \int e^{-\lambda t} dt$$

$$u(t) = -\lambda t$$

$$dt = -\frac{1}{\lambda} du$$

$$\tilde{A}_{t_{\square}} = \left[\frac{-A_0}{\lambda} e^{-\lambda t} \right]_{t_0}^{t_1} = \frac{-A_0}{\lambda} (e^{-\lambda t_1} - e^{-\lambda t_0})$$

Aktivitätskonzentration Zytoplasma und Medium

$V = (\pi \times r^3 \times 4/3)/2$	
Vsphäre um Zelle - V Zelle	
V(r=6 μm)	4,5E-10 cm ³
kum. Aktivität	2,0E-06 MBq*h
	7,2E-03 MBq*s
	7,2E+03 Bq*s
c(Zytoplasma) =	1,6E+13 Bq * s/cm ³
c(Medium) =	2,1E+10 Bq * s/cm ³
Quotient	776

Näherung einer in-vivo Dosis aus in-vitro Daten Metastase Patient 1

Zellkerne/mm ² aus Chatterjee et al., 2015			
Gewebetyp		Zellkerne/mm ²	SD
Gesund	periphere Zone	3299	152
	zentrale Zone	3949	153
	Transitionalzone	3229	194
	MW	3527	123
Karzinom	Gleason-Score 3	4698	169
	Gleason-Score 4	4427	138
	Gleason-Score 5	4894	170
	MW	4628	107

Zelldurchmesser aus Park et al., 2014			
Zelltyp	Zelldurchmesser [µm]	SD	Zelldurchmesser [mm]
LNCaP	13	3	0,013
PC3	15	3	0,015
MW aller CTC	8	2	0,008

S-Werte aus Dose Factor OLINDA	
Sphere mass [g]	S-Wert [mGy/MBq*h]
6	13,3
10	8,0
20	4,0
12	6,7

LNCaP LuPSMA 0,5MBq/2 ml	Metastasenvolumen Patient 1				12 ml	
	0-2h	2-5h	5-24h	24-72h	Summe	
cpm*h		6,4E-02	1,2E-01	1,0E+00	1,3E+00	
MBq*h		5,1E-08	9,4E-08	8,4E-07	1,0E-06	2,0E-06
Zelllinie	Gewebe	ZZ/ml	ZZ in 12ml	Aktivität [MBq*h] in 12ml	Dosis [Gy]	
LNCaP	Gleason-Score 3	3,61E+08	4,34E+09	8612	57	
	Gleason-Score 4	3,41E+08	4,09E+09	8116	54	
	Gleason-Score 5	3,76E+08	4,52E+09	8972	60	
	MW	3,56E+08	4,27E+09	8484	57	
MW aller CTC	Gleason-Score 3	5,87E+08	7,05E+09	13995	93	
	Gleason-Score 4	5,53E+08	6,64E+09	13188	88	
	Gleason-Score 5	6,12E+08	7,34E+09	14579	97	
	MW	5,79E+08	6,94E+09	13787	92	

10.8 Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

(Ort)

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

10.9 Lebenslauf

Sophia Maurer

10.10 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. B. J. Krause, Leiter der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität Rostock, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. C. Bergner für die stetige Unterstützung und bereichernden Diskussionen während des gesamten Promotionsvorhabens. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich sehr herzlich bedanken. Ohne Sie wäre die Verwirklichung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Radiopharmazie und Biochemie der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität Rostock für die Synthese und Bereitstellung der Radiopharmaka.

Den Mitarbeitern des Rudolf-Zenker-Instituts für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock danke ich für die fachliche Expertise, sowie die Möglichkeit der Durchführung der Experimente am Durchflusszytometer.

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie, die nicht nur mein Promotionsvorhaben, sondern auch meinen gesamten bisherigen Werdegang stets unterstützt und ermöglicht hat.