

**Untersuchung zur biologischen Dosimetrie von
schwerioneninduzierten Chromosomenschäden
in peripheren Blutlymphozyten**

**vom Fachbereich Biologie der
Technischen Universität Darmstadt**

zur

**Erlangung des akademischen Grades
eines Doctor rerum naturalium
genehmigte Dissertation**

vorgelegt von

**Torsten Größer
aus Darmstadt**

**Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Kraft
Biophysik, GSI Darmstadt**

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. Paul Layer
Zoologie, TU Darmstadt**

Tag der Einreichung: 19. August 2002

Tag der mündlichen Prüfung: 08. November 2002

Darmstadt 2002

D17

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits wie folgt veröffentlicht:

Größer, T., P. Hessel, S. Ritter, E. Nasonova, E. Gudowska-Nowak (2002). Use of human lymphocytes for radiation risk assessment. In: GSI Scientific Report 2001 (GSI-2002-1 ISSN 0174-0814), S. 161.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	5
2. Einleitung.....	7
2.1. Biologische Dosimetrie.....	7
2.2. Strahleninduzierte DNA-Schäden und deren Detektion.....	8
2.3. Periphere Blutlymphozyten	10
2.4. Zellzyklus.....	11
2.5. Ionisierende Strahlenarten	13
2.6. Einsatz von Ionenstrahlen in der Tumorthherapie.....	15
2.7. Zielsetzung.....	17
3. Material und Methoden	19
3.1. Verwendete Zellen.....	19
3.1.1. Periphere Blutlymphozyten (PBLs).....	19
3.1.2. Chinesische Hamster Zellen (CHO-K1).....	19
3.2. Blutentnahme und Isolierung der Lymphozyten	19
3.3. Bestimmung der Zellzahl und des Zellvolumens	20
3.4. Lagerung und Auftauen der Zellen.....	20
3.5. Zellkultivierung.....	21
3.6. Bestrahlung der Blutlymphozyten	22
3.6.1. Hochenergetische Kohlenstoffionen.....	22
3.6.2. Röntgenstrahlung	22
3.7. Gewinnung der CHO-K1-Mitosen.....	23
3.8. Premature Chromosome Condensation (PCC) -Technik.....	24
3.9. Herstellung von Chromosomen-Präparaten.....	26
3.10. Giemsa-Färbung.....	26
3.11. Auswertung der mit Giemsa gefärbten PCC-Präparate.....	26
3.12. Fluoreszenz plus Giemsa-Färbung (FPG-Färbung).....	27
3.13. Auswertung der Chromosomenschäden in FPG-Präparaten	29
3.14. Bestimmung des Anteils proliferierender Zellen.....	31
3.14.1. Nachweis der Expression des Antigens Ki67.....	31

3.14.2. Nachweis der BrdU-Inkorporation.....	32
3.15. Apoptosemessung	33
3.15.1. ApoNexin-Test.....	33
3.15.2. CDD-ELISA ^{PLUS}	34
3.16. Fehlerrechnung und Kurvenanpassung.....	36
4. Ergebnisse	39
4.1. Vorversuche zum Einfluss von BrdU auf die Messwerte.....	39
4.2. Chromosomenschäden in Metaphasezellen	40
4.2.1. Chromosomenaberrationen in PBLs der 1. Mitose nach Bestrahlung (Spender 1 und 2).....	40
4.2.1.1. Intra-Donor-Effekte.....	41
4.2.1.2. Inter-Donor-Effekte.....	41
4.2.2. Chromosomenaberrationen in PBLs der 2. Mitose nach Bestrahlung (Spender 1 und 2).....	42
4.2.2.1. Intra-Donor-Effekte.....	43
4.2.2.2. Inter-Donor-Effekte.....	43
4.2.2.3. Anzahl an Schwesterchromatidaustauschen (SCEs) in Metaphasen der 2. Mitose nach Bestrahlung der PBLs von Spender 1 und 2.....	43
4.3. Relative Biologische Wirksamkeit (RBW).....	43
4.4. Rogue Zellen	44
4.5. Chromosomenschäden in G ₀ -Zellen von Spender 1 und 2.....	45
4.6. Mitoseindex.....	46
4.6.1. Strahlenbedingte Veränderungen in PBLs verschiedener Spender nach Bestrahlung.....	46
4.6.2. Intra- und Inter-Donor-Effekte.....	47
4.7. Häufigkeitsverteilung von Zellen in der 1. 2. und 3. Mitose nach Stimulierung.....	49
4.7.1. Strahlenbedingte Veränderungen in PBLs verschiedener Spender nach Bestrahlung.....	49
4.7.2. Intra-Donor-Effekte.....	52
4.7.3. Inter-Donor-Effekte.....	52
4.8. Stimulierung.....	52

4.8.1.	Strahlenbedingte Veränderungen in PBLs verschiedener Spender nach Bestrahlung.....	53
4.8.2.	Intra-Donor-Effekte	55
4.8.3.	Inter-Donor-Effekte	56
4.9.	Apoptose	56
4.9.1.	Strahlenbedingte Veränderungen in PBLs verschiedener Spender nach Bestrahlung.....	56
4.9.2.	Intra- und Inter-Donor-Effekte	58
5.	Diskussion	59
5.1.	Ziel und Grundlagen der Untersuchung	59
5.1.1.	Verwendung von PBLs in der biologischen Dosimetrie	59
5.1.2.	Einfluß von BrdU auf zellbiologische Parameter	60
5.2.	Chromosenschäden in Interphasezellen.....	60
5.3.	Chromosenschäden in Metaphasen peripherer Blutlymphozyten.....	61
5.3.1.	Spontanrate von Aberrationen in Kontrollen.....	62
5.3.2.	Vorkommen von „rogue“-Zellen	63
5.3.3.	Dosis-Effekt-Kurven nach Röntgenbestrahlung.....	64
5.3.4.	Dosis-Effekt-Kurven nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen	66
5.3.5.	Die relative biologische Wirksamkeit (RBW).....	67
5.4.	Die Aberrationsrate beeinflussende Faktoren.....	71
5.4.1.	Einfluss von Zellzyklusverzögerungen.....	71
5.4.2.	Einfluss der Stimulierungsrate.....	72
5.4.3.	Einfluss des apoptotischen und nekrotischen Zelltodes	74
5.4.4.	Einfluss individueller bzw. physiologischer Faktoren.....	74
5.5.	Möglichkeiten und Grenzen einer biologischen Dosimetrie	75
5.6.	Einsatz der biologischen Dosimetrie	77
5.7.	Schlussfolgerung und Ausblick	79
6.	Literaturverzeichnis.....	81
7.	Anhang	93
7.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	93

7.2. Verwendete Materialien.....	96
7.2.1. Chemikalien	96
7.2.2. Puffer und Lösungen.....	97
7.2.3. Medien für die Zellkultur.....	98
7.2.4. Verwendete Tests.....	99
7.2.5. Einwegmaterial	99
7.2.6. Laborgeräte.....	100
7.3. Tabellen.....	102
8. Danksagung.....	115

1. Zusammenfassung

Durch die stetig steigende Belastung durch dünn- und dichtungisierende Strahlung in Alltag und Beruf gewinnt das Thema Strahlensicherheit sowie Strahlenschutz immer mehr an Bedeutung. Personen kommen sowohl im medizinischen Bereich als auch im privaten Bereich mit dünnionisierender Strahlung in Kontakt. Aber auch dichtungisierende Strahlung bedingt durch ihren Einsatz in der Strahlentherapie, wie z.B. Protonen oder auch die bei der GSI für die Tumorthherapie verwendeten Kohlenstoffionen (historischer Überblick bei Skarsgard, 1998), spielen eine immer größere Rolle im Zusammenhang mit der Strahlenwirkung. Jedoch kommen Personen nicht nur therapeutisch bedingt mit Teilchenstrahlen unterschiedlicher Energie in Kontakt, sondern auch aus beruflichen Gründen, wie z.B. Astronauten (Testard et al., 1996; Obe et al., 1997; Yang et al., 1997; Testard und Sabatier, 1999; Durante et al., 2001; George et al., 2001b), Arbeiter in Uranminen (Zaire et al., 1997; Lloyd et al., 2001) oder auch Aufräumarbeiter in Tschernobyl (Lazutka et al., 1996; Domracheva et al., 2000). Probleme stellen sich für Mediziner und Strahlenbiologen jedoch dann, wenn es zu unvorhersehbaren Strahlenexpositionen, wie z.B. bei einem Strahlenunfall kommt (Bauchinger, 1995; Lindholm et al., 1996; Bauchinger et al., 2001; Hayata et al., 2001; Sasaki et al., 2001). In solchen Fällen ist es von großem Nutzen, wenn durch die Messung biologischer Veränderungen die empfangene Strahlendosis abgeschätzt werden kann.

Dieses Verfahren wird als biologische Dosimetrie bezeichnet. Mehrere biologische Parameter stehen hierbei zur Auswahl, jedoch stellt die Chromosomenanalyse in peripheren Blutlymphozyten das zur Zeit empfindlichste und zuverlässigste biologische Verfahren zur Quantifizierung von Strahlenexpositionen dar. Periphere Blutlymphozyten sind Zellen unseres Immunsystems und können unkompliziert aus Vollblut isoliert werden. Da Lymphozyten zusätzlich bei einer Strahlenexposition stets involviert sind, sind sie neben Hautfibroblasten das bestgeeignetste Zellsystem zur Untersuchung von Strahlenschäden. In den sechziger Jahren wurden erste Versuche zur Dosisabschätzung vorgenommen und seit dieser Zeit wird die biologische Dosimetrie ergänzend bzw. begleitend zur physikalischen Dosimetrie angewendet (Gooch et al., 1964; Bender und Gooch, 1967). Jedoch beeinflussen bzw. erschweren einige Faktoren eine korrekte Abschätzung der erhaltenen Strahlendosis. Zu diesen Faktoren, die bisher bei der biologischen Dosimetrie nicht berücksichtigt wurden, gehören sowohl unterschiedliche Strahlenempfindlichkeiten zwischen einzelnen Personen (Inter-Donor-Effekt) als auch Unterschiede für ein und denselben Probanden (Intra-Donor-Effekt). Die Untersuchung dieser Faktoren ist das Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit und es wurden hierzu Chromosomenschäden in PBLs zweier weiblicher Blutspender gleichen Alters untersucht. Sollten sich bereits innerhalb bzw. zwischen diesen beiden Probanden Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit zeigen, müsste die in der Literatur vorliegende Auffassung, dass Individuen eine identische sowie langzeitkonstante Strahlenempfindlichkeit aufweisen, überdacht und die bisherige Verwendung einer allgemeingültigen Eichkurve zur Dosisabschätzung in der biologischen Dosimetrie in Frage gestellt werden. Werden bereits Unterschiede hinsichtlich der Strahlenempfindlichkeit in einer geringen Anzahl von Probanden sichtbar, muss davon ausgegangen werden, dass dies auch bei der Untersuchung von höheren Probandenzahlen deutlich wird.

Da die Auswertung von Chromosomenaberrationen in Metaphasezellen auch durch biologische Faktoren beeinflusst wird und dies zu einer Fehleinschätzung des strahleninduzierten Schadens führt, wurden neben der Auswertung der Aberrationsrate in Metaphase- und Interphase-Zellen auch die Proliferation, Stimulation und Induktion von

Apoptose gemessen. Diese Untersuchungen wurden in PBLs gesunder Blutspender nach dünn- und dicht-ionisierender Bestrahlung durchgeführt.

Die Experimente dieser Arbeit zeigten deutliche Schwankungen in den gemessenen Parametern sowohl innerhalb der einzelnen Spender als auch Unterschiede zwischen den Spendern. Ein Unterschied in der Aberrationsrate vom Faktor 2,5 (Abbildung 4.1, unten) nach Bestrahlung mit 400MeV/u Kohlenstoffionen der PBLs zweier Blutspender konnte jedoch durch die Untersuchung dieser biologischen Parameter nicht erklärt werden. Da weiterhin eine zeitlich konstante Aberrationsrate über den Untersuchungszeitraum nachgewiesen wurde, kann in den hier durchgeführten Experimenten ein Einfluss von Zellzyklusverzögerungen auf die Expression von Chromosomenschäden in Lymphozyten ausgeschlossen werden. Daraus folgt, dass die Auswertung von Chromosomenschäden in Metaphasen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder hochenergetischen Kohlenstoffionen unabhängig vom Zeitpunkt der Probenahme ist und die klassische Messung der Aberrationsrate 48h nach Inkubation ausreicht.

Eine zeitliche Änderung der Strahlensensitivität konnte bei Spender 1 und 2 in zwei unabhängigen Röntgenexperimenten nicht nachgewiesen werden, obwohl einige Autoren solch eine Intra-Donor-Variabilität beschreiben (z.B. Kakati et al., 1986; Ricoul et al., 1997). Da die Auswertung von Chromosomenaberrationen in Experimenten, bei denen mehrere Probenzeitpunkte untersucht wurden, bis zu einem halben Jahr in Anspruch nimmt, liegt bisher nur ein Experiment pro Spender mit 400MeV/u Kohlenstoffionen vor. Daher lässt sich nicht mit abschließender Sicherheit eine Schwankung der Strahlenreaktion innerhalb eines Spenders für diese Strahlenqualität ausschließen. Solche Schwankungen beeinträchtigen die Genauigkeit einer biologischen Dosimetrie, wenn sich die Berechnungen auf eine allgemeingültige Eichkurve beschränken. Dies hat zur Folge, dass für eine Dosisabschätzung mit Hilfe der Anzahl an Chromosomenschäden in Zellen mehrere Kurven hergestellt werden und die zu untersuchenden Personen in Subpopulationen unterschiedlicher Strahlensensitivität eingeteilt werden müssen.

Die Unterschiede bei der Anzahl strahleninduzierter Schäden könnte mit einer unterschiedlichen Reparaturkapazität der PBLs zusammenhängen. Wenn solche Strahlensensitivitäten bzw. -resistenzen durch in vitro Bestrahlungen abgeschätzt werden könnten und die Aberrationsrate mit denen aus in vivo Bestrahlungen korrelieren, was bereits von einigen Autoren bestätigt wurde (z.B. Fabry und Lemaire, 1986), könnte die Messung von Chromosomenschäden zur Vorhersage der Strahlenempfindlichkeit („predictive assay“) verwendet werden (Überblick Peters und McKay, 2001). Ein mögliches Einsatzgebiet stellt die Krebstherapie dar und zwar um im Vorfeld der Bestrahlung des Patienten eine Überprüfung der Strahlenreaktion durchzuführen. Sollte eine erhöhte bzw. verringerte Strahlensensibilität im Vergleich zur mittleren Strahlenempfindlichkeit festgestellt werden, könnten diese Ergebnisse in die Bestrahlungsplanung mit einfließen und somit wäre eine individuelle Bestrahlung möglich. Für Mediziner wäre es auch von großem Interesse wenn Vorhersagen der Reaktionen des gesunden Gewebes auf Strahlung möglich wären und sie anhand dieser Erkenntnisse eine strahlenbiologische Spätreaktion vermindern könnten.

2. Einleitung

2.1. Biologische Dosimetrie

Seit den sechziger Jahren wird versucht, die Dosis von strahlenexponierten Personen anhand von biologischen Veränderungen in peripheren Blutlymphozyten (PBLs) abzuschätzen (Gooch et al., 1964; Bender und Gooch, 1967; Überblick in Müller und Streffer, 1991; Wolff, 1991). Bei diesem Verfahren, das als biologische Dosimetrie bezeichnet wird, wird mit Hilfe von Eichkurven, die in in vitro Experimenten gewonnen wurden, ein Zusammenhang zwischen der Strahlendosis und der Anzahl an Mikrokernen (Fenech und Morley, 1985; Fenech und Morley 1986; Mitchell und Norman, 1987; Prosser et al., 1988), der Apoptoserate (Menz et al., 1997; Abend et al., 2000) oder der Anzahl an Chromosomenschäden pro Zelle (Lloyd et al., 1975; Edwards et al., 1979; Pantelias und Maillie, 1984; Finnon et al., 1995; Edwards, 1997; Prasanna et al., 2000) hergestellt. Die am häufigsten angewendete Methode ist die Chromosomenanalyse wobei Änderungen der Chromosomenzahl (numerische Aberration) und der Chromosomenstruktur (strukturelle Aberrationen) quantitativ erfasst werden. Die bisher durchgeführten Experimente zur Herstellung von Eichkurven beschränken sich in erster Linie auf dünnionisierende Strahlung, wie z.B. Röntgen- oder Gammastrahlung (Edwards et al., 1979; Bauchinger, 1995; Lindholm et al., 1998; Barquinero et al., 1999; Stronati et al., 2001). Daten für dichtionisierende Strahlung, wie z. B. Neutronen oder Ionen, liegen nur vereinzelt vor (Fabry et al., 1985; Edwards, 1997; Bauchinger und Schmid, 1998; Durante et al., 1998).

Die biologische Dosimetrie anhand von Chromosomenschäden wird bereits nachträglich oder ergänzend zur physikalischen Dosimetrie eingesetzt und liefert zusätzlich wichtige Informationen wie z.B. bei Strahlenunfällen (Bauchinger, 1995; Lindholm et al., 1996; Bauchinger et al., 2001; Hayata et al., 2001; Sasaki et al., 2001) oder bei der Abschätzung des Strahlenrisikos von natürlicher Strahlung sowie kosmischer Strahlung für Astronauten (Testard et al., 1996; Obe et al., 1997; Yang et al., 1997; Testard und Sabatier, 1999; Durante et al., 2001; George et al., 2001b). Im Bereich der Strahlentherapie könnte die biologische Dosimetrie von großem Nutzen sein und zwar sowohl bei der Vorhersage der individuellen Strahlenempfindlichkeit (Peters und McKay, 2001) als auch zur Untersuchung der Ganzkörperbelastung nach der Bestrahlung des Patienten (Durante et al., 2000; Vorobtsova et al., 2001). Die Auswertung der Anzahl und Art von Chromosomenschäden in PBLs von Überlebenden der Atombombenabwürfe über lange Zeiträume hinweg liefert darüber hinaus wichtige Erkenntnisse über die Halbwertszeit von Aberrationen und ermöglicht eine Abschätzung der Schädigung von Stammzellen (Awa et al., 1978; Nakano et al., 2001).

Jedoch gibt es bei der Auswertung von Chromosomenschäden in Metaphasezellen widersprüchliche Meinungen darüber, welche Arten von Schäden berücksichtigt werden sollten (Sharpe et al., 1969; Lindholm et al., 1996; Lindholm et al., 1998). Einige Arbeitsgruppen beschränken sich auf die Auswertung der Anzahl von dizentrischen Chromosomen, da diese einfach zu detektieren sind und in Kontrollpopulationen nur etwa 1 dizentrisches Chromosom in 1000 Zellen (Edwards, 1997) gefunden wird. Dizentrische Chromosomen gehören jedoch zu den instabilen Aberrationen (Kapitel 2.2.) und bei jeder Zellteilung vermindert sich ihre Anzahl um 50% (Sasaki und Norman, 1967; Bedford et al., 1978; Scott und Lyons, 1979; Bauchinger et al., 1986). Dies gilt sowohl für Stammzellen als auch für PBLs nach in vitro Stimulierung und kann zu einer Unterschätzung des

strahleninduzierten Schadens führen, wenn ein langer Zeitraum zwischen Strahlenexposition und der Untersuchung liegt. Daher wird heute auch die Auswertung von stabilen Aberrationen, wie z.B. Translokationen, diskutiert (Barquinero et al., 1999; Bauchinger et al., 2001; Pala et al., 2001; Stronati et al., 2001). Diese sind über einen sehr langen Zeitraum in den PBLs nachweisbar und erfahren durch die Zellteilung nur eine geringe Reduktion (z.B. Lindholm et al., 1996; Lindholm et al., 1998; Pala et al., 2001).

Um zu verhindern, dass der durch Zellteilung bedingte Verlust von Aberration zur Unterschätzung der Strahlendosis führt, sollen PBLs in der 1. Mitose nach Bestrahlung untersucht werden (Überblick in Müller und Streffer, 1991; Wolff, 1991). Untersuchungen in den letzten Jahren zeigten eine weitere Schwierigkeit, wenn „in vitro“ die Effektivität von Hoch-LET-Strahlung ($LET \geq 100\text{keV}/\mu\text{m}$) bestimmt werden soll. Messungen ergaben, dass stark geschädigte Zellen die erste Mitose nach Bestrahlung mit erheblichen Verzögerungen erreichen (Durante et al., 1998; Anderson et al., 2000; George et al., 2001a) wie in Kapitel 2.2. näher erläutert wird. Diese mitotische Verzögerung hat zur Folge, dass es zu einer Unterschätzung des strahleninduzierten Schadens kommen kann (Poncelet et al., 1988), wenn Metaphasen nur zu einem Zeitpunkt, d.h. 48h nach Bestrahlung, untersucht werden, wie es im Standardprotokoll vorgesehen ist (Beninson et al., 1986). Die Untersuchung von Interphasezellen durch das Verfahren der vorzeitigen Chromosomenkondensation („premature chromosome condensation“ PCC) erlaubt eine exaktere Bestimmung des primären Schadens und wird im Gegensatz zur klassischen Auswertung von Metaphasechromosomen nicht oder nur geringfügig von Zellzyklusverzögerungen beeinflusst (Johnson und Rao, 1970; Pantelias und Maillie, 1983; Gotoh et al., 1995).

Ein zusätzlicher Faktor, der die Genauigkeit einer biologischen Dosimetrie beeinflusst, ist die Verwendung fremder Eichkurven zur Dosisabschätzung. Bei Auswertungen von Chromosomenpräparaten der gleichen Probe durch verschiedene Labore wurden deutliche Unterschiede (Inter-Labor-Effekte) in der Aberrationsrate gefunden (Bianchi et al., 1982; Lloyd et al., 1988; Lloyd et al., 1992). Diese Unterschiede führten unter anderem zu der Schlussfolgerung, dass jedes Labor eigene Referenz- bzw. Eichkurven zur Abschätzung einer empfangenen Dosis anfertigen muss (Bianchi et al., 1982). Jedoch wird bisher ausschließlich eine Eichkurve für die jeweilige Strahlenart bzw. den jeweiligen biologischen Schaden zur Abschätzung der Dosis verwendet und keine individuellen Eichkurven angefertigt, da in vielen Experimenten nur Variationen im Bereich von 10% bis 20% zwischen den Blutspendern gefunden wurden (z.B. Sharpe et al., 1969; Scott und Lyons, 1979; Fabry et al., 1985; Lindholm et al., 1998). Im Gegensatz dazu wurden von einigen Autoren Unterschiede in den Aberrationsraten verschiedener Spender bis zu einem Faktor von 3 nachgewiesen (Kakati et al., 1986; Ricoul et al., 1997). Deutliche Hinweise auf eine individuelle Strahlenempfindlichkeit wurden darüber hinaus auch im Mikrokerntest (Catena et al., 1992; Huber et al., 1992) und bei der Messung der Apoptoserate (Crompton et al., 2001) gefunden. Solche großen Unterschiede in der intrinsischen Strahlensensibilität erschweren den Einsatz der biologischen Dosimetrie und vermindern ihre Genauigkeit bei der Dosisabschätzung deutlich.

2.2. Strahleninduzierte DNA-Schäden und deren Detektion

Seit den 40er Jahren wurden Chromosomenschäden als Ursache für den strahlenbedingten Zelltod angesehen. Für eine Bewertung der schädigenden Wirkung von Strahlen werden in der Regel Zellen in der Metaphase durch Colcemid arretiert, Chromosomenpräparate hergestellt und die induzierten Chromosomenaberrationen unter dem Lichtmikroskop untersucht. Chromosomenschäden sind eine Folge der primären Strahlenschäden an der DNA

und hier vor allem der Doppelstrangbrüche. Nichtreparierte Brüche sind auf Chromosomenebene als Fragmente sichtbar. Fehlreparatur geschädigter DNA-Stränge führt zu einer Vielzahl von Austauschaberrationen wie z.B. dizentrische Chromosomen, Ringe oder Translokationen (siehe Kapitel 3.13.).

Bei strahlenbiologischen Untersuchungen wird häufig nur die Anzahl an instabilen Aberrationen, wie z.B. azentrische Fragmente sowie di-, tri- und polyzentrische Chromosomen, gemessen. Sie werden als instabil bezeichnet, da bei jeder Zellteilung ein Teil dieser Aberrationen und damit des Genoms verloren geht, was meist zum Tod der betroffenen Zelle führt. Zum Beispiel reduziert sich die Anzahl der di- bzw. trizentrischen Chromosomen um 50% bzw. 75% pro Zellteilung (Sasaki und Norman, 1967) und die Anzahl an azentrischen Fragmenten um 20% (Bauchinger et al., 1986) bis 70% (Sasaki und Norman, 1967).

Auf die Auswertung von sogenannten stabilen Aberrationen, wie z.B. reziproken Translokationen oder Insertionen, bei denen Bereiche zweier oder mehrerer Chromosomen ausgetauscht und die an die Tochterzelle weitergegeben werden, wurde in der Vergangenheit häufig verzichtet. Diese Aberrationen können nur mit aufwendigen Färbemethoden wie dem „Giemsa-Banding“ oder der Fluoreszenz in situ Hybridisierung kurz FISH genannt (Pinkel et al., 1986; Gray et al., 1994; Jordan et al., 1999) detektiert werden, wobei die Methoden mit einem hohen Zeit- und im Falle von FISH auch Kostenaufwand verbunden sind. Da der Nachweis stabiler Aberrationen auch längere Zeit nach Induktion in proliferierenden Zellen möglich ist und sie eine Transformation der betroffenen Zelle bewirken können (Rabbitts, 1994), wird die Abschätzung von Spätfolgen einer Strahlenexposition diskutiert (z.B. Awa et al., 1978).

Die Auswertung sowohl von instabilen als auch stabilen Chromosomenschäden in Metaphasezellen wird durch mehrere Faktoren beeinflusst, eine der wichtigsten stellt die Zellzyklusverzögerung dar, deren Dauer von der Strahlendosis und der Art der Schäden abhängt (Blakely et al., 1980; Ritter et al., 1990; Scholz, 1992; Anderson et al., 2000). Starke Verzögerungen treten vor allem nach Bestrahlung mit niederenergetischen Schwerionen, d.h. Teilchenstrahlen mit einer geringen Fluenz und einem hohen LET, auf (Scholz et al., 1994; Ritter et al., 1996), da hier eine hohe inhomogene Verteilung hinsichtlich der Teilchendurchgänge pro Zellkern vorliegt und folglich die Zellpopulation neben ungetroffenen bzw. leichtgeschädigten auch schwergeschädigte Zellen enthält, die die Mitose erst sehr spät erreichen. Für immortalisierte Zelllinien ergeben sich dadurch Verzögerungen, die sehr viel länger als die normale Zellzykluszeit sein können. Geringe bzw. gleichmäßige Zellzyklusverzögerungen werden dagegen nach Röntgenbestrahlung bzw. Bestrahlung mit hochenergetischen Ionen beobachtet, da es sich hierbei um eine homogene Energiedeposition handelt und nur geringe Unterschiede in der Anzahl der Schäden pro Zelle vorliegen (Purrott et al., 1980; Ritter et al., 1992; Scholz et al., 1994; Ritter et al., 1996). In primären Zellen, wie z.B. bei Fibroblasten, kommt es nach Bestrahlung stets zu Zellzyklusverzögerungen und darüber hinaus zu einem beschleunigten Übergang von der potentiell mitotisch aktiven Phase zur postmitotischen Phase, in der sie zu Funktionszellen differenzieren. So wurde von Berger (2001) in humanen Hautfibroblasten gezeigt, dass nur noch 3% der Zellen die 1. Mitose nach Bestrahlung mit 1,5Gy Kohlenstoff- oder 8Gy Nickelionen erreichen. Sie differenzieren zu Funktionszellen aus (z.B. Fournier et al., 2001). Dieser Prozess ist irreversibel im Gegensatz zum reversiblen Ausscheren von Zellen in die G_0 -Phase. Neben der beschleunigten Differenzierung können geschädigte Fibroblasten in geringem Umfang auch den programmierten Zelltod einleiten (Berger, 2001). In Lymphozyten wurde nach Bestrahlung sowohl eine mitotische Verzögerung nachgewiesen (Lloyd et al., 1977; Scott und Lyons, 1979; Purrott et al., 1980; Poncelet et al., 1988; Durante et al., 1998; George et al., 2001a) als

auch eine erhöhte Apoptoserate (Boreham et al., 1996; Hertveldt et al., 1997; Menz et al., 1997; Louagie et al., 1998b; Meijer et al., 1998; Kern et al., 1999).

Mit Hilfe der „Premature Chromosome Condensation“ (PCC) Methode kann das Problem der Zellzyklusverzögerung umgangen bzw. reduziert werden. Hierzu werden entweder Interphasezellen mit mitotischen Zellen fusioniert, deren Mitosefaktoren eine verfrühte Kondensation der Chromosomen in den Interphasezellen bewirken (Johnson und Rao, 1970; Rao et al., 1981) oder es werden Chemikalien eingesetzt, wie z.B. Calyculin, die zu einer frühzeitigen Kondensation führen (Gotoh et al., 1995; Coco-Martin und Begg, 1997). Je nach Vorbereitung der zu untersuchenden Zellen können Schäden in verschiedenen Zellzyklusphasen dokumentiert werden. Befinden sich die Zellen durch Kontaktinhibition oder aus physiologischen Gründen, wie z.B. bei den peripheren Blutlymphozyten, in der G₀-Phase, so können durch Fusion mit mitotischen Zellen G₀-PCCs erzeugt werden (Pantelias und Maillie, 1984; Greinert et al., 1995; Sipi et al., 2000). Durch das Aufheben der Kontaktinhibition oder durch Stimulierung wie im Falle der PBLs und anschließender Fusion, können sowohl G₀-, G₁- als auch G₂-PCCs untersucht werden, sowie Zellen in der Mitosephase (M-Phase). Der Einsatz von Chemikalien bei proliferierenden Zellen ermöglicht die Auswertung von G₁- und G₂-PCCs sowie von M-Phase-Zellen (Durante et al., 1999). Die in dieser Arbeit angewandte Methode der Fusion von ruhenden Zellen in der G₀-Phase mit mitotischen Zellen, erlaubt die Bestimmung des erzeugten Initialschadens und die Untersuchung der Reparaturkapazität der Zellen hinsichtlich strahleninduzierter DNA-Schäden. Trotz der beschriebenen Vorteile der PCC-Methode mittels Fusion wird sie selten durchgeführt, da sie technisch aufwendiger ist als die klassische Präparation von Metaphasechromosomen.

Die Untersuchung der Reparaturkapazität von G₀-Zellen wird durch die Apoptose beeinflusst, denn sie ist in unstimulierten PBLs deutlich höher als in stimulierten (Carloni et al., 2001). Ungeachtet der verwendeten Methode und der Auswertung von Zellen in Meta- oder Interphase, würde ein Verlust an schwergeschädigten Zellen eine Unterschätzung des strahleninduzierten Schadens zur Folge haben.

2.3. Periphere Blutlymphozyten

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten PBLs sind Zellen unseres Immunsystems und sind für die körpereigene Immunantwort verantwortlich. Es handelt sich bei den Lymphozyten, die auch als weiße Blutkörperchen bezeichnet werden, um Zellen mit geringem Zytoplasmaanteil und einem großen, chromatindichten, runden Zellkern. Ihr Durchmesser beträgt ca. 6µm und ihr Volumen liegt bei 170µm³ (Überblick in Beninson et al., 1986). Lymphozyten stammen von pluri- bzw. unipotenten lymphoiden Stammzellen im Knochenmark ab. Sie werden in Knochenmark, Lymphknoten, Thymus und Milz gebildet und gelangen hauptsächlich über die Lymphbahnen ins Blut. Es befinden sich ca. 2% der Lymphozyten im peripheren Blut, 70% in den Organen des lymphatischen Systems, 10% im Knochenmark und der Rest in anderen Organen. Im menschlichen Körper werden zwei Arten von Lymphozyten unterschieden:

Die T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark, reifen im Thymus heran und sind für die zelluläre Immunreaktion verantwortlich. Ihr Anteil im Blut ist vom Alter abhängig und beträgt 70-80% der Gesamtzahl an Lymphozyten.

Die B-Lymphozyten, die im Blutplasma enthalten sind, werden vom Knochenmark gebildet. Sie sind für die sogenannte humorale Immunität verantwortlich und bilden nach Kontakt mit

körperfremden Antigenen spezifische Antikörper. Ihr Anteil im Blut beträgt 20-30% der Gesamtzahl an Lymphozyten.

Sowohl die T- als auch die B-Lymphozyten befinden sich überwiegend in einer Ruhephase, der sogenannten G_0 -Phase. Sie besitzen die Fähigkeit sich zu teilen, jedoch müssen sie hierzu stimuliert werden. Im Körper geschieht dies durch spezifische Antigene. Bei in vitro Experimenten müssen hingegen dem Zellkulturmedium spezielle Mitogene (z.B. Phythämagglutinin) zur Stimulation der Lymphozyten zugegeben werden (Hungerford et al., 1959). Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendete Phythämagglutinin (PHA) handelt es sich um ein Protein aus der Bohnenpflanze *Phaseolus vulgaris*, welches vorwiegend T-Lymphozyten stimuliert (Überblick in Beninson et al., 1986). Die B-Lymphozyten werden erst nach einigen Tagen durch die aktivierten T-Lymphozyten stimuliert (Han und Dadey, 1978), so dass bei der Untersuchung von Chromosomenschäden in mitotischen Zellen bis 96h nach der Stimulierung überwiegend T-Lymphozyten analysiert werden. Die Tatsache, dass sich Lymphozyten bei Experimentbeginn in der G_0 -Phase befinden, mit Ausnahme einer geringen Anzahl durch Antigene stimulierter Lymphozyten, ist für strahlenbiologische Experimente von Vorteil, da die Strahlenempfindlichkeit vom Zellzyklusstadium abhängt (Kapitel 2.4.). Einen weiteren Vorteil stellt die einfache Entnahme der Zellen dar. Periphere PBLs können aus Blutproben durch unkomplizierte Verfahren (Kapitel 3.2.) isoliert und anschließend für in vitro Experimente verwendet werden. Entscheidend für die Wahl der PBLs zur Verwendung für strahlenbiologische Experimente ist jedoch die Tatsache, dass Blut und somit auch die Lymphozyten bei medizinischen Strahlentherapien als auch bei Strahlenunfällen stets involviert sind.

2.4. Zellzyklus

Die Strahlenempfindlichkeit der Zellen ändert sich im Verlauf des Zellzyklus (Gillespie et al., 1975; Bedford et al., 1978; Geard, 1985; Todd, Zaider, 1996), daher ist es für Bestrahlungsexperimente von großer Bedeutung in welchem Stadium des Zellzyklus die Strahlenexposition stattfindet. Darüber hinaus zeigen Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit gegenüber dünn- und dichtungisierender Strahlung (Raju et al., 1980).

Der Zellzyklus stellt den Zeitraum zwischen der Mitte einer Mitose und der Mitte der darauffolgenden Mitose dar und ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt. Er wird in zwei Phasen unterteilt, die Mitosephase (M-Phase) und die Interphase. Die M-Phase besteht aus der Kernteilung (Mitose) und der Teilung des Cytoplasmas (Cytokinese). In der Mitose findet die Trennung der Schwesterchromatiden der Chromosomen statt, so dass jede der beiden Tochterzellen einen kompletten Chromosomensatz (Tochterchromosomen) erhält. Im Anschluß an die Chromosomenverteilung findet die eigentliche Zellteilung statt, die Cytokinese. Die Interphase läßt sich in drei Phasen unterteilen, die G_1 -, S- und die G_2 -Phase. Die G_1 -Phase ($G = „gap“$) entspricht dem Zeitraum zwischen der M-Phase und der S-Phase und dient der Zelle ihre Zellmasse zu erhöhen. Die Dauer dieser Phase ist sehr variabel und beeinflusst dadurch die Gesamtdauer des Zellzykluses. Die sich anschließende S-Phase (Synthesephase) ist relativ kurz; in ihr findet die Replikation der DNA statt. In der G_2 -Phase wird die Zelle auf die M-Phase vorbereitet. Es wird zusätzlich eine vierte Phase der Interphase beschrieben, die G_0 -Phase. Hierbei handelt es sich um eine Ruhephase der Zellen, in der sie keine Teilungsaktivität aufweisen. Die Zellen scheren dabei in der G_1 -Phase aus dem Zellzyklus aus und können nun für einen unbestimmten Zeitraum in dieser Ruhephase verbleiben. Die Zellen sind jedoch jeder Zeit in der Lage in den Zellzyklus zurückzukehren.

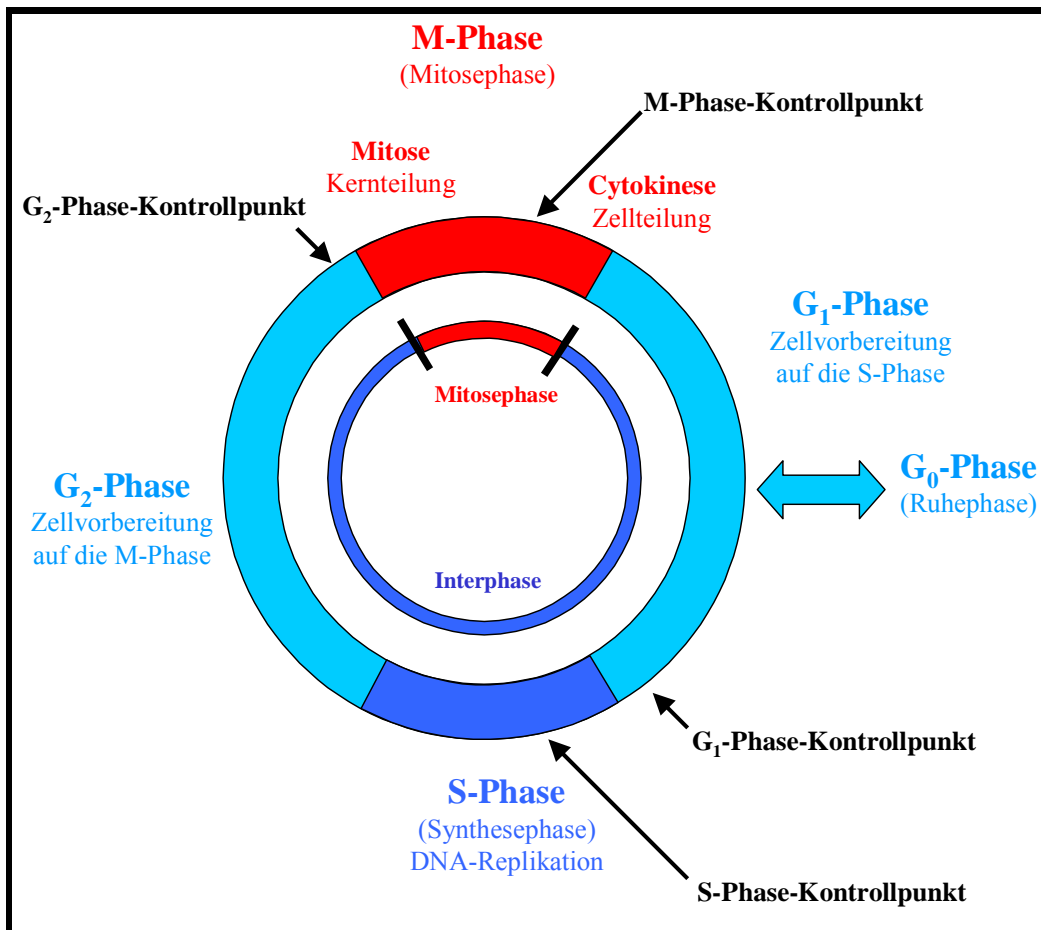


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Zellzyklus mit den entsprechenden Kontrollpunkten in Anlehnung an Alberts et al. (1999).

Innerhalb des Zellzyklus befinden sich mehrere Zellzykluskontrollpunkte, von denen vier gut charakterisiert sind. Der erste befindet sich am Ende der G_1 -Phase, der G_1 -Kontrollpunkt, hier wird überprüft ob die DNA intakt ist und die Zellen ihr benötigtes Volumen erreicht haben. Weitere Kontrollpunkte befinden sich in der S-Phase (S-Kontrollpunkt) und nach der DNA-Synthese am Ende der G_2 -Phase (G_2 -Kontrollpunkt), die sicher stellen sollen, dass die DNA-Replikation korrekt verlaufen bzw. abgeschlossen wurde. Ein weiterer Kontrollpunkt befindet sich in der M-Phase (M-Kontrollpunkt), der das Anheften der Spindelfasern an die Kinetochor-Region der Chromatiden der Schwesterchromosomen kontrolliert und somit eine korrekte Aufteilung des genetischen Materials auf die Tochterzellen gewährleistet (Wells 1996; Übersicht bei Alberts et al., 1999).

Kommt es nun zur Schädigung der DNA in einer der Zellzyklusphasen oder treten Fehler bei der Mitose bzw. der DNA-Replikation auf, wird der Zellzyklus am nachfolgenden Kontrollpunkt angehalten und mit Hilfe von Reparaturmechanismen wird versucht, den Fehler zu beheben, bevor die Zelle im Zellzyklus weiter voranschreitet. Diese Art von Zellzyklusverzögerungen treten z.B. bei bestrahlten Zellen auf. Die Dauer der Verzögerung hängt hierbei von Anzahl und Art des strahleninduzierten DNA-Schadens ab, d.h. sowohl von der Dosis als auch vom LET (Blakely et al., 1980; Ritter et al., 1992; Scholz, 1992; Scholz et al., 1994). Dies bedeutet, dass Zellen mit einem hohen DNA-Schaden langsamer im Zellzyklus voranschreiten als ungeschädigte Zellen (Lloyd et al., 1977; Ritter et al., 1996; Anderson et al., 2000; George et al., 2001a). Zellen, die nicht in der Lage sind den Schaden zu reparieren, können permanent arretiert werden (Berger 2001) und ausdifferenzieren (Fournier et al., 2001) wie z.B. humane Hautfibroblasten, oder den Weg des programmierten Zelltodes

(Apoptose) wählen wie z.B. PBLs (z.B. Dewey et al., 1995; Vermes et al., 1995; Boreham et al., 1996; Hertveldt et al., 1997; Menz et al., 1997; Louagie et al., 1998a; Meijer et al., 1998; Louagie et al., 1998b; Shounan et al., 1998; Kern et al., 1999; Meijer et al., 1999; Abend et al., 2000; Carloni et al., 2001; Crompton et al., 2001; Jaworska et al., 2001).

2.5. Ionisierende Strahlenarten

Ionisierende Strahlen haben die Eigenschaft aus den Atomen der Materie, die sie durchdringen, Elektronen herauszuschlagen und die Atome zu ionisieren. Dadurch können chemische Bindungen aufgebrochen werden und biologische Schäden entstehen. Zu den ionisierenden Strahlen gehören hochenergetische UV-Strahlen, elektromagnetische Strahlen wie Röntgen- und Gammastrahlung, leichte Teilchen wie Elektronen und schwere Teilchen wie Protonen oder Ionen (Kiefer, 1989; Alpen, 1998).

In der Strahlenbiologie wird zwischen dünn- und dichtionisierenden Strahlen unterschieden. Bei dünnionisierender Strahlung, wie z.B. bei Röntgenstrahlung, sind die Ionisationsprozesse und somit auch die strahlenbiologischen Schäden weit voneinander entfernt. Bei dichtionisierender Strahlung, wie z.B. Protonen- oder Schwerionenstrahlung, liegen die Ionisationsereignisse als dichte Spur entlang der Bahn des Teilchens und bewirken eine hohe lokale Schadensdichte (Ward, 1985; Goodhead, 1989; Krämer und Kraft, 1994; Kraft et al., 1999). Diese Unterschiede in der Energiedeposition führen auch zu Unterschieden in der Art der erzeugten Strahlenschäden (z.B. Gerasimenko et al., 1980; Heilmann et al., 1996; Ritter et al., 1996; Durante et al., 1998; Ohara et al., 1998). Die Reparatur solcher durch Teilchenstrahlen erzeugten Schäden ist weniger effizient als die durch dünnionisierende Strahlung induzierten Aberrationen (Goodwin et al., 1994; Heilmann et al., 1996).

Zum Vergleich der Wirkung unterschiedlicher Strahlenarten werden in der Strahlenbiologie 250kV Röntgenstrahlung als Referenzstrahlung verwendet. Die relative biologische Wirksamkeit (RBW) einer Teststrahlung ist dabei definiert als Quotient der Strahlendosis (D) der Referenzstrahlung und der Dosis der Teststrahlung, die jeweils zum gleichen strahlenbiologischen Effekt führt:

Formel 2.1:

$$\text{RBW} = \frac{\text{D(250kV Röntgenstrahlung)}}{\text{D(Teststrahlung)}}$$

Experimente und Rechnungen zeigen eine starke Abhängigkeit der RBW vom linearen Energietransfer (LET) (Überblick in Kraft, 2000). Der LET beschreibt die Energieabgabe bzw. den Energieverlust dE/dx in Kiloelektronenvolt (keV) pro Mikrometer (μm) Weglänge eines Teilchens beim Durchgang durch biologische Materie. Die Dosis, die hierbei übertragen wird, steht mit der Fluenz über den LET in Zusammenhang:

Formel 2.2:

$$D = 1,6 \times 10^{-9} \times LET \times F \times \frac{1}{\rho}$$

D Dosis [Gy]
 LET Linearer Energietransfer [keV/μm]
 F Teilchenfluenz [1/cm²]
 ρ Dichte [g/cm³], für Wasser ρ = 1 g/cm³

Der LET ist von der kinetischen Energie und der Ladung des Projektilions abhängig und wird sowohl von der Dichte als auch von der Kernladung der durchdrungenen Materie (Target) beeinflusst. Für biologische Targets wird der LET-Wert in Wasser als Näherung verwendet. Mit zunehmendem LET steigt der RBW bis zu einem Maximum an und fällt dann steil ab (Kapitel 5.3.5., Abbildung 5.3), wobei der Verlauf der Kurve für die einzelnen Ionenarten unterschiedlich ist, da die Maxima mit steigender Ordnungszahl (Z) deutlich zu höheren LET-Werten verschoben sind (Barendsen et al., 1963; Wulf et al., 1985; Weyrather et al., 1999; Kraft, 2000).

Neben der Abhängigkeit der RBW von physikalischen Eigenschaften der Strahlung wird ihre Messung auch von biologischen Faktoren wie z.B. der Reparaturkapazität der verwendeten Zellen beeinflusst (z.B. Weyrather et al., 1999). Dies ist in Abbildung 2.2 anhand der Überlebenskurven von chinesischen Hamsterzellen (CHO-K1 und xrs5) dargestellt. Bei der Zelllinie xrs5 handelt es sich um eine chemisch induzierte Mutante der CHO-K1-Zellen. Diese Mutante ist, bedingt durch eine drastische Reduktion der Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen, gegenüber Strahlung sehr empfindlich.

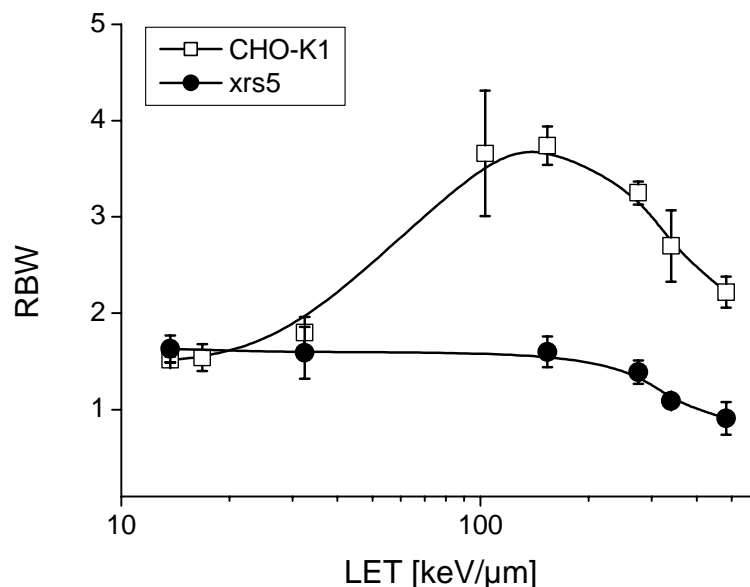


Abbildung 2.2: Relative biologische Wirksamkeit (RBW) in Abhängigkeit vom linearen Energietransfer (LET) bei einem Überlebensniveau von 10% von CHO-K1-Zellen und ihrer DNA-Doppelstrangbruch reparaturdefizienten Mutante xrs5 (aus Weyrather et al., 1999; modifiziert).

Mit abnehmender Geschwindigkeit bzw. Energie des Projektils steigt der LET bis zu einem Maximum an, für Kohlenstoff liegt dieses Maximum bei einer Energie von ca. 0,5 MeV/u, um dann wieder etwas abzufallen. Durch die Geschwindigkeitsabnahme erhöht sich die Wechselwirkungszeit des Projektils mit der biologischen Materie und die Dosis erreicht ein scharfes Maximum im „Bragg-Peak“-Bereich, kurz bevor das Teilchen in der Materie stoppt. Dieses Bragg-Maximum ist charakteristisch für Tiefendosisprofile von Teilchenstrahlen. Die Lage dieses Maximums bzw. Eindringtiefe der Teilchen läßt sich über die Wahl der Eintrittsenergie der Teilchen in die Materie variieren. Tiefendosisprofile verschiedener Strahlenarten, mit zum Teil unterschiedlichen Energien, sind in Abbildung 2.3 dargestellt. Der Verlauf der Tiefendosiskurven ist der ursprüngliche Grund Ionen in der Therapie zu verwenden.

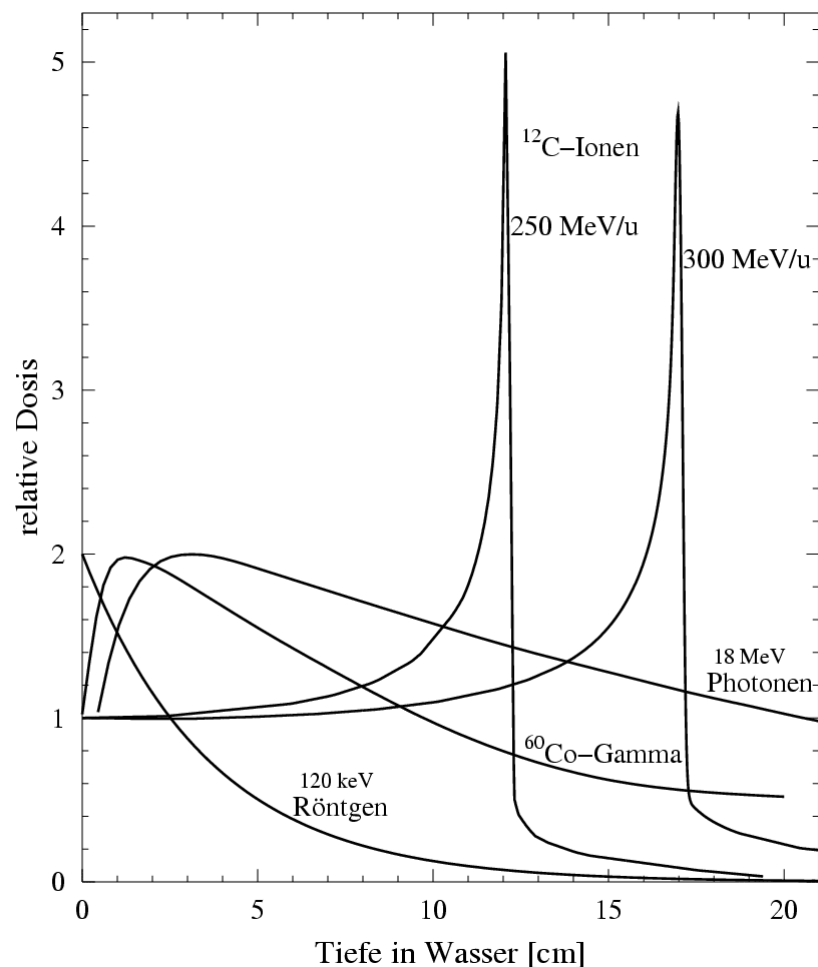


Abbildung 2.3: Tiefendosisprofil von Röntgen-, ^{60}Co -Gamma- und 18MeV/u Photonen-Strahlung im Vergleich zu 250 und 300MeV/u Kohlenstoffionen. Die Position des Bragg-Maximums hängt von der Energie der Ionen ab und kann durch die Wahl der geeigneten Energie in der Tiefe bzw. Reichweite variiert werden.

2.6. Einsatz von Ionenstrahlen in der Tumorthherapie

Ionenstrahlen, wie z.B. Protonen, die weltweit am häufigsten in der Tumorthherapie zur Anwendung kommen oder die bei der GSI verwendeten Kohlenstoffionen, zeigen gegenüber den konventionell verwendeten Photonenstrahlen einige Vorteile. Neben der deutlich besseren Dosisdeposition, bedingt durch das invertierte Dosisprofil (Abbildung 2.3), weisen

Schwerionen zusätzlich eine erhöhte biologische Wirksamkeit auf. Da bei hochenergetischen Photonenstrahlen die im Gewebe deponierte Dosis nach einem kurzem Anstieg mit zunehmender Tiefe stetig abfällt, wird bei der Bestrahlung eines tiefliegenden Tumors im gesunden Gewebe vor dem Zielvolumen eine höhere Dosis deponiert als im Tumor. In der Therapiepraxis wird diese Dosis durch mehrere Einzelstrahlrichtungen, der sogenannten „Kreuzfeuertechnik“, auf ein größeres Volumen des gesunden Gewebes verteilt. Trotzdem ist die Integraldosis im gesunden Gewebe und damit das Risiko von Nebenwirkungen und Spätfolgen größer als die therapeutische Tumordosis. Das invertierte Tiefendosisprofil von Protonen- und Ionenstrahlen ermöglicht eine bessere Dosisverteilung, wobei eine hohe Dosis im Tumorgewebe deponiert werden kann, bei gleichzeitiger Schonung des gesunden Gewebes (z.B. Tobias et al., 1979; Kraft, 1990; Durante et al., 2000).

Durch die beschriebenen Vorteile der Ionenstrahlen können tiefliegende und strahlenresistente Tumore effektiver behandelt werden. Da Kohlenstoffionen zusätzlich eine geringe biologische Wirksamkeit im Eintrittskanal aufweisen und eine deutlich erhöhte im Tumolvolumen, werden sie für die Tumorthherapie verwendet (Überblick in Kraft, 2000). Auch die mit steigender Ordnungszahl abnehmende Reichweiten- und Seitenstreuung stehen bei Kohlenstoffionen in einem akzeptablen Verhältnis zur zunehmenden Entstehung von leichten Fragmenten durch Kernreaktionen (Kraft, 1990).

Von Wilson wurde 1946 erstmals die Verwendung von Protonen zur Behandlung von Krebspatienten vorgeschlagen. Am LBL (Lawrence Berkeley National Laboratory; Berkeley, USA) wurde im Jahre 1954 mit der Behandlung von Krebspatienten mit Protonen am BEVALAC begonnen. Diese Protonentherapie wurde 1957 durch die Bestrahlung der Tumore mit Heliumionen am 184inch Cyclotron ergänzt, die bis zur Stilllegung des Beschleunigers im Jahre 1992 fortgeführt wurde. Zusätzlich wurden im Zeitraum von 1975 bis 1992 Schwerionen am BEVALAC zur Tumorbestrahlung verwendet und zwar zunächst Argon und später Neon (Überblick in Sisterson, 2001). Zur Zeit wird weltweit an drei Instituten eine Tumorthherapie mit Schwerionen durchgeführt. In Chiba (Japan) wurden seit 1994 über 1000 Patienten behandelt und seit 2001 steht in Hyogo (Japan) ein zweiter Therapiebeschleuniger zur Verfügung, an dem bislang über 10 Patienten bestrahlt wurden. An der GSI in Darmstadt (Deutschland) konnten seit 1997 über 140 Patienten behandelt werden (Schulz-Ertner et al., 2002). Beim Therapieprojekt der GSI wird erstmals eine dreidimensionale tumorkonforme Bestrahlung mit Hilfe des Raster-Scan-Verfahrens (Haberer et al., 1993) und eine Online-Kontrolle des Ionenstrahles durch Verwendung der Positronen-Emissions-Tomographie PET eingesetzt (Enghardt et al., 1999). Der Einsatz dieser Techniken in der Tumorthherapie erhöht nicht nur die Präzision der Dosisverteilung sondern auch die Kontrolle der Bestrahlung und somit die Sicherheit.

Darüber hinaus wird bei der GSI erstmals die physikalische Bestrahlungsplanung mit einer biologischen Bestrahlungsplanung kombiniert. Das Modell zur biologischen Wirkung von Teilchenstrahlen (Krämer und Scholz, 2000) basiert auf Erkenntnissen, die durch jahrelange Arbeit aus in vitro Experimenten gewonnen wurden (z.B. Wulf et al., 1985; Aufderheide et al., 1987; Weyrather et al., 1999). Die hierbei gemessenen RBW stimmte mit den berechneten Werten des Modells gut überein. Die Genauigkeit der biologischen Bestrahlungsplanung wurde erfolgreich in mehreren in vivo Experimenten an Minischweinen und Ratten als Modellsystem überprüft.

2.7. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von dünn- und dicht-ionisierender Strahlung auf humane PBLs gesunder Blutspender zu untersuchen. Hierzu liegen in der Arbeitsgruppe (Biophysik, GSI Darmstadt) bereits eine umfassende Anzahl an Experimenten mit etablierten Säugetier-Zellen, wie z.B. CHO-K1-, xrs5- und V79-Zellen (Ritter et al., 1992; Scholz et al., 1994; Ritter et al., 1996; Weyrather et al., 1999), sowie humanen Hautfibroblasten (Größer, 1998; Berger, 2001; Fournier et al., 2001) vor. Für die Ausdehnung dieser Experimente auf humane PBLs sprach die einfache Entnahme der Zellen, die gerade bei der Untersuchung mehrerer gesunder Personen von großem Vorteil ist. In diesem Zusammenhang wurden biologische Veränderungen in der Aberrationsrate von Meta- und Interphasezellen sowie der Zellproliferation, des Mitoseindex, der Induktion von Apoptose und der Stimulation von Zellen gemessen. Diese Untersuchungen sollten Auskunft über eine eventuell vorhandene individuelle Strahlensensibilität geben. Dies ist für Mediziner sowie Strahlenbiologen von großem Interesse, da Schwankungen in der Reaktion von Zellen verschiedener Spender auf Strahlung gleicher Dosis und Qualität die Genauigkeit einer biologischen Dosimetrie beeinflussen würde. Bei großen Unterschieden in der individuellen Strahlenempfindlichkeit würde eine einzelne Eichkurve nicht zur Abschätzung der erhaltenen Strahlendosis ausreichen. Die zu untersuchenden Personen müssten in Subpopulation mit einer ähnlichen Strahlensensibilität eingeteilt werden und für jede Gruppe müsste eine eigene Eichkurve erstellt werden. Zu diesem Thema liegen in der Literatur kontroverse Ergebnisse vor, die zum einen individuelle Strahlensensitivitäten in PBLs nachweisen (z.B. Scott und Lyons, 1979; Ricoul et al., 1997) und zum anderen keine Unterschiede in der Strahlenreaktion verschiedener Spender erkennen (z.B. Sharpe et al., 1969; Lindholm et al., 1998).

Da zur Zeit die Chromosomenanalyse in PBLs das empfindlichste und zuverlässigste biologische Verfahren zur Quantifizierung von Strahlenexpositionen darstellt, stand die Auswertung von Chromosomenschäden in Metaphasezellen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Weil die Anzahl an Aberrationen durch biologische Faktoren beeinflusst werden kann, sollten einige dieser Parameter bestimmt werden, zu denen unter anderem die Zellzyklusverzögerungen zählt. Wenn stark geschädigte Zellen später als ungeschädigte oder gering geschädigte Zellen die erste Mitose nach Bestrahlung erreichen, so würde eine Probenentnahme zu frühen Zeitpunkten (klassisch nach 48h) eine Unterschätzung des strahlenbiologischen Schadens zur Folge haben. Daher sollten Proben über einen Zeitraum bis zu 96h nach Bestrahlung gemessen werden. Ein Anstieg der Aberrationsrate über die Zeit ist dann ein Indiz für vorhandene Zellzyklusverzögerungen geschädigter Zellen. Weiterhin sollten die Apoptose- und die Stimulierungsrate der PBLs nach Bestrahlung untersucht werden. In erster Linie ist hierbei von Interesse, ob es zu einer dosisabhängigen Veränderung dieser Parameter kommt, die wiederum die Auswertung von Chromosomenschäden in Metaphase beeinflussen würden. Durch die Bestimmung dieser biologischen Parameter, aber vor allem durch die Messung von Chromosomenaberrationen in Metaphasen der ersten Mitose zu späteren Probenzeitpunkten, wird der Umfang der Experimente erhöht. Daher sollen Chromosomenaberrationen und DNA-Schäden zunächst in PBLs einiger weniger Probanden untersucht werden. Auftretende Unterschiede in der Strahlensensibilität könnten dann in folgenden Forschungsprojekten durch die Ausdehnung der Auswertungen auf weitere Blutspender untermauert werden.

Die erhaltenen Ergebnisse sollen eine erste Abschätzung der Möglichkeit des Einsatzes der Auswertung von Chromosomenaberrationen als „predictive assay“ erlauben. Für die Strahlentherapie wäre es von großem Vorteil, wenn individuelle Strahlensensitivitäten von

Patienten im Vorfeld der Bestrahlung abgeschätzt werden könnten. Hierzu würden in vitro Experimente mit PBLs der einzelnen Patienten vorgenommen und die Anzahl an strahleninduzierten Chromosomenschäden in Metaphasepräparate bestimmt. Ein Vergleich der Aberrationsraten könnte eine Einschätzung der Strahlensensibilität gestatten und diese Ergebnisse würden, wenn sie in die Bestrahlungsplanung mit einfließen, eine individuelle Strahlentherapie ermöglichen

3. Material und Methoden

Die verwendeten Materialien werden im Anhang unter Kapitel 7.2 aufgeführt. Alle Chemikalien entsprachen pA-Qualität. Wasser zum Ansetzen von Lösungen und Puffer wurde in einer Reinstwasseranlage (Millipore) durch Umkehrosmose erzeugt und vor Verwendung stets autoklaviert. Im Folgenden wird dieses hochreine Wasser als MilliQ bezeichnet.

Eine schematische Übersicht des Experimentenablaufes mit den verwendeten Methoden zeigt Abbildung 3.6 (Seite 38).

3.1. Verwendete Zellen

3.1.1. Periphere Blutlymphozyten (PBLs)

Für die Experimente wurden periphere Blutlymphozyten von fünf gesunden Spendern verwendet (Tabelle 3.1). Alle Blutspender hatten sich freiwillig zur Verfügung gestellt und es handelte sich stets um Nichtraucher. Das Alter der Blutspender lag im Bereich von 34 bis 51 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 42 Jahren. Die regelmäßigen Untersuchungen der Blutspender auf HIV („Human Immuno-deficiency Virus“), HBV (Hepatitis B) und HBC (Hepatitis C) ergaben stets negative Befunde.

Blutspender	Geschlecht	Alter im Zeitraum der Experimente in Jahren
Spender 1	W	40 – 44
Spender 2	W	40 – 44
Spender 3	M	47 – 51
Spender 4	M	39 – 43
Spender 5	M	34 – 38

Tabelle 3.1: Informationen über die freiwilligen Spender, deren Blutlymphozyten für die Experimente verwendet wurden (w = weiblich; m = männlich).

3.1.2. Chinesische Hamster Zellen (CHO-K1)

Diese Zellen wurden ausschließlich als „Inducer“-Zellen bei der PCC-Methode verwendet (Kapitel 3.8). Bei der Zelllinie CHO-K1 handelt es sich um Ovarzellen aus dem chinesischen Hamster (*Cricetulus griseus*), deren Eigenschaften im Detail von Deaven und Petersen (1973) beschrieben wurden. Die Zellen wurden von Prof. Dr. P. Virsik-Köpp der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt.

3.2. Blutentnahme und Isolierung der Lymphozyten

Die Blutentnahme wurde im Labor durch eine qualifizierte MTA durch Punktion der Armvene durchgeführt. Hierfür wurde ein Blutentnahme-Set und Vacutainer® CPT™ („Cell Preparation Tube“) Röhrchen verwendet, die im Folgenden kurz als Vacutainer bezeichnet werden. Das Blut wurde steril durch den Vakuumsog aus der Vene über einen Adapter direkt ins Röhrchen entnommen. Die verwendeten Vacutainer enthalten ein Antikoagulans

(Natrium-Heparin) und ein kombiniertes Gel/Ficoll-Trennsystem. Pro Vacutainer können ca. 8ml Blut aufgetrennt werden.

Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden die Vacutainer bei 2900Upm (1600g) für 20min zentrifugiert. Während der Zentrifugation sammeln sich die mononukleären Zellen wie z.B. Lymphozyten und Monozyten im Ficoll oberhalb des Trenngels, das eine stabile und undurchlässige Barriere zum Pellet aus Erythrozyten bzw. Granulozyten bildet. Über der Schicht mit mononukleären Zellen befindet sich das Blutplasma.

Das Blutplasma wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Schicht mit den mononukleären Zellen wurde mit einer Pipette in 10ml Zentrifugenröhrchen überführt. In jedes Zentrifugenröhrchen wurde die Ausbeute an mononukleären Zellen von maximal zwei Vacutainern gegeben. Oberhalb des Trenngels wurden die Vacutainer mit Medium I gespült und dieses Medium ebenfalls in die Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zentrifugenröhrchen wurden mit Medium I aufgefüllt und anschließend bei 1500Upm (ca. 390g) für 10min ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand (Medium I) verworfen, das Zellpellet resuspendiert, die Zellzahl bestimmt (Kapitel 3.3.) und die Zellen für die Bestrahlung aufgeteilt (Kapitel 3.6.).

3.3. Bestimmung der Zellzahl und des Zellvolumens

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit dem Zellanalysesystem Casy 1 (Schärfe System) durchgeführt. Zur Messung wurden die Zellen in einem schwachen Elektrolyten suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine elektrolytgefüllte Kapillare gesaugt, die einen definierten elektrischen Widerstand darstellt. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Da intakte Zellen in erster Näherung als Isolator betrachtet werden können, kommt es zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke. Diese Widerstandsänderung ist zugleich ein Maß für das Volumen der Zellen. Voraussetzung für dieses Messverfahren ist, dass die Zellen die Messpore einzeln passieren, daher ist ein sorgfältiges Vereinzeln der Zellen äußerst wichtig.

Für die Messung der Lymphozyten bzw. CHO-K1-Zellen wurden 200µl Zellsuspension in 10ml isotoner Lösung (Casyton) verdünnt. Der Messbereich betrug bei den PBLs 6-15µm und bei den CHO-K1-Zellen 9-20,55µm. Die Zellzahl pro ml wurde unmittelbar nach der Verdünnung gemessen.

Darüber hinaus wurde das Volumen von CHO-K1-Zellen nach dem mitotischen Abschütteln (Kapitel 3.7.) mit dem Zellanalysesystem Coulter Counter (Coulter) bestimmt, um den prozentualen Anteil an Zellen in der Mitose während dieses Vorgangs abschätzen zu können.

3.4. Lagerung und Auftauen der Zellen

Eine Lagerung der PBLs wurde nicht vorgenommen. Unmittelbar vor jedem Experiment wurde dem jeweiligen Blutspender das Blut frisch abgenommen.

Die CHO-K1-Zellen wurden in speziellem Einfriermedium eingefroren, welches zum Schutz der Zellen DMSO enthielt und dem zusätzlich beim Einfrieren der CHO-K1-Mitosen 5µl/ml Colcemid zugegeben wurde. Die Stammkulturen der CHO-K1-Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -196°C und die CHO-K1-Mitosen für die PCC-Methode in einem

Tiefkühlschrank bei -80°C in 2ml Kryoröhrchen gelagert. Die Zellkonzentration betrug stets $1,1 \times 10^6$ Zellen pro ml. Es wurden maximal 1,8ml Zellsuspension pro Kryoröhrchen eingefüllt. Das Einfrieren der Zellen wurde zunächst in speziellen Einfrierbehältern vorgenommen, die mit Isopropanol gefüllt waren und in denen die Zellen für einen Tag bei einer Temperatur von -80°C inkubiert wurden. Dann wurden die Kryoröhrchen in Aufbewahrungsbehälter überführt, die entweder in Stickstoff oder bei -80°C gelagert wurden.

Das Auftauen der CHO-K1-Zellen erfolgte in einem auf 37°C vorgewärmtem Wasserbad. Da sowohl bei den CHO-K1-Zellen als auch bei den CHO-K1-Mitosen DMSO als Frostschutz im Medium vorhanden war und DMSO über 0°C toxisch auf die Zellen wirkt wurde das Einfriermedium gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht. Die für die PCC-Methode verwendeten Mitosen wurden daher in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit 4ml frischem Medium I (+ 50 μl Colcemid) aufgefüllt und 6min bei 1000Upm (170g) zentrifugiert (Kapitel 3.8.). Die Stammkulturen, die in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, wurden in 75cm² Zellkulturflaschen mit ca. 10ml HAM'S F12-Medium ausgesät. Nach ca. 2 Stunden wurde das Anheften der Zellen lichtmikroskopisch überprüft und ein Mediumwechsel durchgeführt, um das DMSO zu entfernen.

3.5. Zellkultivierung

Alle verwendeten Zellen wurden in Begasungsbrutschränken von Heraeus bei 37°C , 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Für die Zellkultivierung wurden Zellkulturflaschen (12,5, 25, 75, 225cm²), Roller-Flaschen (850cm²) sowie Zentrifugenröhrchen (10ml) verwendet. Um den Gasaustausch zu gewährleisten, wurden die Deckel nicht fest verschlossen oder Gasaustauschkappen (0,2 μm Porenweite) verwendet. Bei der Handhabung von Zellen, deren Zellkulturmedium BrdU enthielt, wurde das Labor abgedunkelt.

Die peripheren Blutlymphozyten wurden nach der Bestrahlung als Suspensionskultur mit einer Konzentration von 0,3 bis $0,4 \times 10^6$ Zellen/ml Medium in Kulturflaschen (12,5cm²) bzw. Zentrifugenröhrchen (10ml) kultiviert. Die Kulturflaschen wurden mit maximal 6ml Zellsuspension gefüllt und aufrecht in den Brutschrank gestellt. Bei der Kultivierung der PBLs in Zentrifugenröhrchen betrug das maximale Volumen an Zellsuspension 5ml. Die Röhrchen wurden umgelegt um die Oberfläche für den Gasaustausch zu vergrößern. Es wurde für die Isolierung und Bestrahlung der PBLs sowie für die PCC-Proben stets RPMI 1640-Medium verwendet, dem 20% fötales Rinderserum, 1% L-Glutamin, 1% Neomycin/Bacitracin und 0,2% Natrium-Heparin (Medium I) zugesetzt wurde. Für alle weiteren Experimente, die mit proliferierenden Zellen durchgeführt wurden, wie die Chromosomenanalyse in M-Zellen, Untersuchungen zum Stimulierungsverhalten der PBLs und zur Induktion der Apoptose, wurde dem Medium I zusätzlich 1% Phythämagglutinin (PHA) zur Stimulation der Zellen, 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BrdU und 4,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DC zugesetzt (Medium II). Die PBLs wurden unmittelbar vor dem Versuch entnommen (Kapitel 3.2.) und am gleichen Tag bestrahlt. Daher wurde auch kein Mediumwechsel während der Kultivierungsdauer durchgeführt.

Für die Chromosomenpräparation wurde der Zellsuspension 3 Stunden vor Probenaufarbeitung Colcemid zugegeben, ein Spindelgift, das eine Anreicherung der Zellen in der Mitose bewirkt. Die Konzentration betrug 200ng Colcemid pro ml Medium.

Die CHO-K1-Zellen wurden als adhärente Monolayer-Kulturen in Zellkulturflaschen (75cm²) kultiviert. Dem Zellkulturmedium HAM'S F-12 wurden 10% fötales Rinderserum, 1% L-Glutamin und 1% Neomycin/Bacitracin zugegeben (Medium III). Die Zellen wurden zweimal

pro Woche passagiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen und verworfen, die Zellen mit 1ml Trypsin gespült und dieses Trypsin ebenfalls verworfen. Anschließend wurden 3ml Trypsin in die Kulturflasche pipettiert und die Zellen für ca. 5min in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert, die Zellen durch mehrmaliges aufziehen mit einer 2ml Pipette vereinzelt und die enzymatische Reaktion des Trypsins durch Zugabe der doppelten Menge Medium, bezogen auf das Trypsinvolumen, abgestoppt. Die Zellzahl wurde bestimmt (Kapitel 3.3.) und 150000 CHO-K1-Zellen pro 75cm² Zellkulturflaschen ausgesät.

Für die Gewinnung der CHO-K1-Mitosen wurde eine hohe Zellanzahl benötigt, daher wurden die Zellen zunächst in 225cm² Zellkulturflaschen und anschließend in Roller-Flaschen kultiviert. Einzelheiten zur Zellvermehrung werden in Abschnitt 3.7. näher erläutert.

3.6. Bestrahlung der Blutlymphozyten

Die Bestrahlungen mit dichtungisierenden hochenergetischen Kohlenstoffionen und dünnionisierender Röntgenstrahlung wurden an der GSI bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurden stets unstimulierte PBLs, d.h. Zellen in der G₀-Phase, bestrahlt. Die Zellen wurden in Kühltaschen vom Labor an der Bestrahlungsplatz transportiert um Temperaturschwankungen zu minimieren. Die Kontrollen wurden zum Bestrahlungsplatz mitgeführt und dort für die Dauer der Bestrahlung deponiert.

3.6.1. Hochenergetische Kohlenstoffionen

Die Bestrahlung der PBLs mit hochenergetischen Kohlenstoffionen wurde am Schwerionensynchrotron (SIS) der GSI durchgeführt und zwar mit Energien von 400MeV/u (LET = 11keV/μm; LET_{min} = 10,85keV/μm; LET_{max} = 11,02keV/μm) bzw. 100MeV/u (LET = 28keV/μm; LET_{min} = 26keV/μm; LET_{max} = 31keV/μm). Da der Durchmesser der Röhren, die für die Bestrahlung verwendet wurden, 1cm betrug und es über diese Eindringtiefe zu einer Änderung des LET's kommt, wurde hier die entsprechenden Mittelwerte und Extrema angegeben. Die Zellen wurden mit Dosen von 1 bis 4Gy bestrahlt bei einer Dosisleistung von ca. 2Gy pro Minute. Dabei wurde der Teilchenstrahl mit Hilfe des Raster-Scanners (Haberer et al., 1993) über die Probe geführt. Das Prinzip des Raster-Scan-Verfahrens zur konformen Bestrahlung beruht darauf, dass ein feiner Teilchenstrahl mit Hilfe von Ablenkmagneten rasterförmig über das zu bestrahlende Zielvolumen, welches in Schichten gleicher Reichweite zerlegt wurde, geführt wird. Die Dosimetrie wurde mit Hilfe von Ionisationskammern durchgeführt, die entweder mit Kernspur-Detektoren (CR39-Plättchen) oder geeichten Ionisationskammern kalibriert wurden, wie im Detail bei Heeg et al. (1999) beschrieben ist.

Für die Bestrahlung wurden die Zellen in 5ml Kryoröhrchen überführt. Die Zellkonzentration der Suspension betrug hierbei maximal 4 x 10⁶ Zellen/ml Medium I, da es bei höheren Zellkonzentrationen während der Bestrahlung, die ca. 30min bis zu 1 Stunde dauert, zu Sauerstoffmangel und Änderung des pH-Wertes in der Zellsuspension kommen kann (M. Durante, persönliche Mitteilung).

3.6.2. Röntgenstrahlung

Als Referenzstrahlung wurde Röntgenstrahlung verwendet. Die Proben wurden an einer Röntgenröhre (Hersteller Seifert) bei einer Spannung von 250kV und einer Stromstärke von 16mA bestrahlt. Die Anode der Röhre bestand aus Wolfram, als Austrittsfenster wurde eine

Berylliumfolie (7mm) verwendet. Die weichen Anteile der Strahlung wurden in Filtern (1mm Aluminium und 1mm Kupfer) absorbiert. Dosis und Dosisleistung wurden mit Hilfe einer nach Fricke und Hart (1966) kalibrierten Ionisationskammer (Stabdosisimeter DL4, Pychlau) ermittelt. Die Zellen wurden mit Dosen von 1 bis 10Gy bestrahlt bei einer Dosisleistung von 2 bis 3Gy pro Minute.

Die Bestrahlung der PBLs wurde in 25cm² Zellkulturflaschen durchgeführt, wobei die Flaschen mit maximal 5ml Zellsuspension gefüllt wurden. Bei der Bestrahlung der Zellen wurde wie auch in den Experimenten mit Kohlenstoffionen eine Konzentration von 4 x 10⁶ Zellen/ml Medium I nicht überschritten,.

3.7. Gewinnung der CHO-K1-Mitosen

Mitotische CHO-K1-Zellen wurden für die Durchführung der PCC-Technik in G₀-Phase-PBLs (Kapitel 3.8.) benötigt. Um CHO-K1-Zellen in Mitosephase zu gewinnen, wurde das Verfahren des mitotischen Abschüttelns angewandt. Bei diesem Verfahren macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass sich Zellen während der Mitose abrunden und den Kontakt zur Oberfläche der Zellkulturflasche verringern. Die mitotischen Zellen können durch leichtes Klopfen oder Drehen gelöst und durch anschließende Zentrifugation des Mediums gewonnen werden. Durch die Zugabe des Spindelgiftes Colcemid zum Kulturmedium können mitotische Zellen angereichert werden, da es die Zellen in der M-Phase arretiert.

Zur Gewinnung der CHO-K1-Mitosen wurden die Zellen in 850cm² Roller-Flaschen kultiviert, die aufgrund ihrer großen Oberfläche das Erreichen einer sehr hohen Zellzahl ermöglichen. Für die Experimente wurden die Zellen nach dem Auftauen ca. 14 Tage kultiviert (Kapitel 3.5.). Anschließend wurden 0,5 x 10⁶ Zellen in 225cm² Kulturflaschen ausgesät, nach drei Tagen geerntet und 10 x 10⁶ Zellen pro Roller-Flasche ausgesät. Die Roller-Flaschen wurden in die Roller-Apparatur eines Begasungsbrutschrankes (Biocenter 2001, Tecnomara) eingesetzt und in 200ml Medium III rotierend kultiviert, so dass die Zellen ständig mit Medium benetzt wurden. Nach 48 Stunden wurde das Kulturmedium gegen 75ml Medium III mit 50ng pro ml Colcemid ausgetauscht. Nach 20minütiger Inkubation der Zellen wurden jeweils zwei der Roller-Flaschen in eine spezielle Apparatur (Eigenbau der GSI) eingesetzt und für 1 bis 2min bei ca. 200Upm gedreht, um Zelltrümmer und nicht angeheftete Zellen zu entfernen. Das Medium wurde abgenommen und mit Hilfe des Casy 1 die Zellzahl und die Zellgrößenverteilung bestimmt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Intervalle zwischen dem Ernten der mitotischen Zellen auf zwei bis drei Stunden ausgedehnt. Sobald die Zellsuspension mindestens 95% mitotische Zellen enthielt, wurde sie in 50ml Falcon Röhrchen pipettiert. Dies wurde mittels der Zellgrößenverteilung (Casy) bzw. mittels der Zellvolumenverteilung (Coulter) zunächst abgeschätzt und durch die Herstellung und Auswertung von Chromosomenpräparaten (Kapitel 3.9.) überprüft. Die Mitosen wurden nun 15min bei 1200Upm (250g) zentrifugiert (Minifuge RF), der Überstand abgegossen und das Pellet in einer entsprechenden Menge Einfriermedium (+ 50ng/ml Colcemid) aufgenommen, um eine Konzentration von 2 x 10⁶ Zellen/1,8ml Medium zu erhalten. Jeweils 1,8ml der Zellsuspension wurden in Kryoröhrchen pipettiert und bei -80°C in einem Tiefkühlschrank gelagert (Kapitel 3.4.). Es konnten drei- bis viermal Mitosen geerntet werden, bis nicht mehr ausreichend Zellen in den Roller-Flaschen vorhanden waren bzw. der Anteil an mitotischen Zellen unter 95% fiel.

3.8. Premature Chromosome Condensation (PCC) -Technik

Eine der Möglichkeiten Zellen außerhalb der Mitose anzuregen ihr Chromatin zu kondensieren, ist die Fusion mit mitotischen Zellen. Hierbei werden Fusionsmittel wie Polyethylenglycol oder Sendai-Viren benutzt, die eine Perforation der Zellmembranen bewirken und dadurch ein verschmelzen von Zellen ermöglichen. Durch die Fusion wirken die mitotischen Faktoren der M-Phase-Zelle auch auf die Interphasezelle und bewirken hier, wie in der mitotischen Zelle, eine „frühzeitige“ Kondensation des Chromatins. Diese Methode, die auch als PCC-Technik bezeichnet wird und erstmals von Johnson und Rao (1970) beschrieben wurde, ermöglicht eine mikroskopische Untersuchung von Chromosomenschäden außerhalb der Mitosephase (M-Phase). Die Durchführung der PCC-Technik erfolgte in Anlehnung an Pantelias und Maillie (1983).

Werden asynchrone Zellen mit mitotischen Zellen fusioniert und mit einem Mikroskop untersucht, stellen sich die Chromosomen, je nachdem in welchem Stadium des Zellzyklus sich die Zellen befinden, unterschiedlich dar (Rao et al., 1981). Chromosomen von Zellen, die sich in der G₁-Phase bzw. in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden, besitzen nur einen DNA-Doppelstrang bzw. eine Chromatide. Die Chromosomen erscheinen als feine einzelsträngige Gebilde und sind geringer gefärbt als die Chromosomen der mitotischen Zellen. Zellen in der G₂-Phase hingegen besitzen Chromosomen mit zwei Chromatiden, die jedoch, bedingt durch einen geringeren Kondensationsgrad, länger als die Chromatiden von Metaphase-Chromosomen sind. Die Chromosomen in der S-Phase liegen als „pulverisierte“ DNA-Wolke vor. Schäden können hier nicht ausgewertet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden PBLs in der G₀-Phase mit CHO-K1-Mitosen fusioniert (Abbildung 3.1). Die PBLs wurden nach der Bestrahlung entweder sofort fusioniert, um das Ausmaß des Initialschadens (ID) zu bestimmen oder für 20 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um die Fähigkeit der Zellen, die bei der Bestrahlung entstandenen DNA-Schäden zu reparieren, zu untersuchen. Hierzu wurde Polyethylenglycol als Fusionsmittel eingesetzt. Alle Zentrifugationen wurden in der Minifuge RF mit Bremse bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zur Durchführung der Zellfusion wurden CHO-K1-Mitosen aufgetaut (Kapitel 3.4.) und in ein Zentrifugenröhrchen mit 4ml Medium I überführt. Das verwendete Medium wurde zuvor auf Eis gekühlt und mit 50µl Colcemid versetzt, um ein Fortschreiten der CHO-K1-Mitosen im Zellzyklus zu verhindern. Um das DMSO im Überstand zu entfernen wurden die Mitosen 6min bei 1000Upm (170g) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet resuspendiert und mit gekühltem Medium I (+ 50µl Colcemid) überschichtet, so dass eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml vorlag. Nun wurden 1×10^6 PBLs und 1×10^6 Mitosen in einem Rundbodenröhrchen durch mehrmaliges Aufziehen in einer 2ml Pipette gemischt. Rundbodenröhrchen wurden verwendet, damit das entstehende Pellet eine große Oberfläche aufweist und somit die Kontaktfläche mit dem später zugegebenen Polyethylenglycol erhöht wird.

Die Zellsuspension wurde nun 5min bei 1000Upm (170g) zentrifugiert, dann der Schaum, der beim Durchmischen der Zellen entstanden war, vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet über Kopf ca. 1min getrocknet. Damit wurde erreicht, dass sich keine Flüssigkeit bzw. Schaum auf dem Pellet befand, da sonst der Kontakt zum Polyethylenglycol verringert und somit die Fusion der Zellen erschwert würde. Das Zellpellet wurde mit 100µl Polyethylenglycol (Raumtemperatur) überschichtet. Hierzu wurde die Eppendorfspitze vor dem Pellet angesetzt, wobei das Röhrchen mit der Öffnung nach

unten gehalten wurde, um zu vermeiden, dass an der Röhrenwand befindlicher Schaum oder Mediumreste zurück auf das Pellet fließen. Die Eppendorfspitze wurde zuvor ca. 1cm abgeschnitten, um die Öffnung zu vergrößern, da das Polyethylenglycol sehr dickflüssig ist. Das Röhrchen wurde nun umgedreht und gleichzeitig das Polyethylenglycol vorsichtig über das Pellet pipettiert. Nachdem das Polyethylenglycol 1,5min eingewirkt hatte, wurde mit einer 1ml Pipette 0,5ml PBS (w/o) vorsichtig hinzugegeben, so dass zwei Phasen entstanden. Durch leichtes Klopfen mit dem Finger wurden unter Schlierenbildung das Polyethylenglycol und das PBS durchmischt, ohne das Pellet zu lösen. Nach 1min wurden erneut 0,5ml PBS hinzugegeben. Durch Schütteln wurde nun das Pellet gelöst, so dass kleine Zellaggregate sichtbar wurden. Die in Polyethylenglycol/PBS gelösten Zellen wurden 4min bei 900Upm zentrifugiert, anschließend dekantiert und ca. 1min über Kopf getrocknet. Es wurden 0,7ml frisches Medium I (Raumtemperatur) vorsichtig an der Röhrenwand zupipettiert und im Anschluß das Pellet durch die Zugabe von 50µl Colcemid gelöst. Die Probe wurde noch einmal sanft geschüttelt, sodass kleine Zellaggregate sichtbar wurden. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für 1 Stunde inkubiert. Während dieser Zeit dürfen die Zellen nicht bewegt werden, um eine hohe Fusionsrate sicherzustellen. Nach der einstündigen Inkubation der Zellsuspension wurden die Präparate wie in Kapitel 3.9. beschrieben weiterbehandelt.

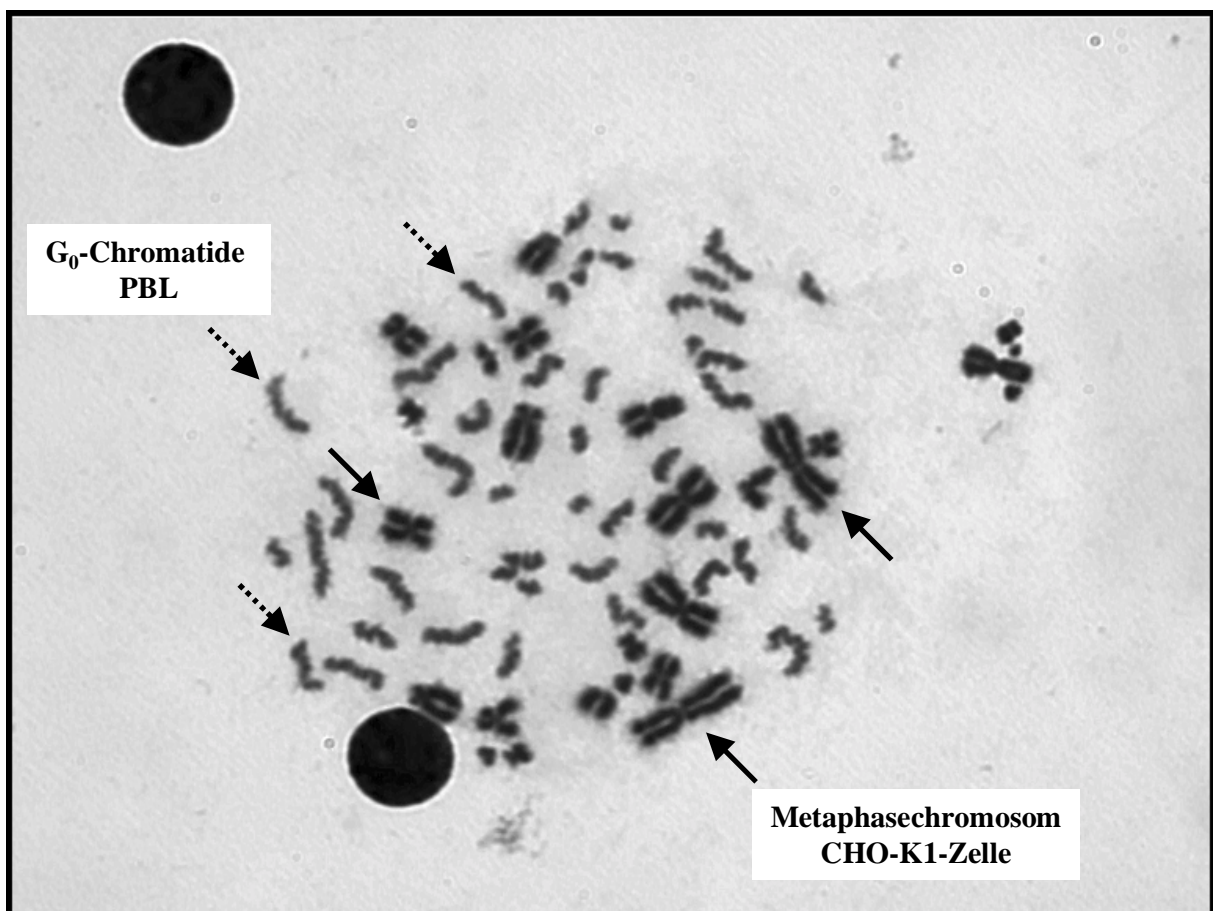


Abbildung 3.1: Fusion einer mitotischen CHO-K1-Zelle („Inducer“-Zelle) mit einem ungeschädigten peripheren Blutlymphozyten in der G₀-Phase. Vergrößerung ca. 1500fach.

3.9. Herstellung von Chromosomen-Präparaten

Die Proben von Metaphase- und Interphase-Zellen wurden auf die gleiche Art und Weise bei Raumtemperatur aufgearbeitet, d.h. die Zellsuspension wurde bei 1200Upm (250g) für 10min. zentrifugiert, der Überstand dekantiert und anschließend durch leichtes Schütteln gelöst. Das Quellen der Zellen wurde durch die tropfenweise Zugabe von 0,075M KCl-Lösung (ca. 37°C) zur Zellsuspension herbeigeführt. Nachdem das Röhrchen zur Hälfte gefüllt worden war, wurde es zügig aufgefüllt. Die Zellen wurden für 8min bei 1000Upm (170g) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet resuspendiert. Anschließend wurden sie mit einer am Gebrauchstag frisch angesetzten Lösung aus drei Teilen Methanol und einem Teil Eisessig (100%ige Essigsäure) fixiert. Das Fixativ wurde tropfenweise zugegeben, um ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden. Die Zellen wurden 10min bei 1200Upm (250g) zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen noch einmal wie zuvor beschrieben in Fixativ gewaschen und zentrifugiert. Die Zellen verblieben im ersten oder zweiten Fixativ mindestens 30min.

Das 2. Fixativ wurde bis auf eine geringe Menge abgegossen und die Zellen resuspendiert. Nach geeigneter Verdünnung wurde die Zellsuspension auf Objektträger getropft. Hierzu wurden die Objektträger mit MilliQ befeuchtet, sodass sich ein gleichmäßiger Wasserfilm auf ihnen bildete. Mit einer Eppendorfpipette wurden 1 oder 2 Tropfen Zellsuspension (16µl/Tropfen) auf einen Objektträger aufgetragen. Das verdrängte Wasser wurde sofort mit einem sauberen Papiertuch entfernt, um eine gute Spreitung der Chromosomen zu erzielen. Die Qualität der Präparate wurde unmittelbar nach dem Trocknen am Mikroskop überprüft. Die getropften Präparate wurden bei Raumtemperatur gelagert und später gefärbt (Kapitel 3.10. und 3.12.). Reste der Zellsuspension wurden bei -20°C gelagert nachdem die Röhrchen mit frischem Fixativ aufgefüllt wurden.

3.10. Giemsa-Färbung

Die PCC-Präparate wurden mit einer 6%igen Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt) in Sörensenpuffer 10min gefärbt und anschließend zweimal in Leitungswasser gewaschen. Die gefärbten Präparate wurden über Nacht getrocknet (Raumtemperatur) und anschließend mit einem Deckglas und drei bis vier Tropfen Eukitt eingedeckt.

3.11. Auswertung der mit Giemsa gefärbten PCC-Präparate

Die mit Giemsa gefärbten PCC-Präparate wurden bei 1000facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop analysiert und pro Probe 50 Fusionen ausgewertet.

Da bei den Experimenten nur unstimulierte, d.h. G₀-PBLs, verwendet wurden, besteht das Genom der ungeschädigten fusionierten PBLs aus 46 einzelnen Chromatiden, die auch als PCC-Fragmente bezeichnet werden (Abbildung 3.1). Durch die Bestrahlung der Zellen werden DNA-Brüche induziert, wobei DNA-Doppelstrangbrüche zu einer Erhöhung der Fragmentenzahl bezogen auf die jeweilige Kontrolle führen. Nur Fusionen mit ≥ 45 Chromatiden bzw. PCC-Fragmenten wurden ausgewertet.

3.12. Fluoreszenz plus Giemsa-Färbung (FPG-Färbung)

Die Fluoreszenz plus Giemsa-Färbung ist eine differenzielle Färbung, die es ermöglicht Zellen in der ersten, zweiten oder höheren Mitose nach Bestrahlung zu unterscheiden (Perry und Wolff, 1974). Hierzu werden die Zellen in Medium mit BrdU, einem Thymidin-Analogon, kultiviert. Da die Zellen zwischen diesen beiden Basen nicht unterscheiden können, werden während der S-Phase sowohl Thymidin als auch BrdU in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Die FPG-Färbung beruht darauf, dass nach UV-Bestrahlung und Waschen der Zellen die Metaphasen in der ersten, zweiten oder höheren Mitose nach Zugabe von BrdU zum Zellkulturmedium Unterschiede in der Anfärbbarkeit mit Giemsa aufweisen. Es wird vermutet, dass durch UV-Bestrahlung DNA-Strang-Brüche an den Stellen induziert werden, an denen BrdU eingebaut wurde und dass durch nachfolgendes Waschen der Zellen diese DNA entfernt wird. Unter dem Lichtmikroskop ist eine Aufhellung der Giemsa-Färbung von Chromatiden erst sichtbar, wenn beide DNA-Stränge einer Chromatide teilweise mit BrdU substituiert sind. Die Folge ist, dass Chromosomen von Zellen in der ersten Mitose nach BrdU-Zugabe noch komplett dunkel erscheinen (Abbildung 3.2).

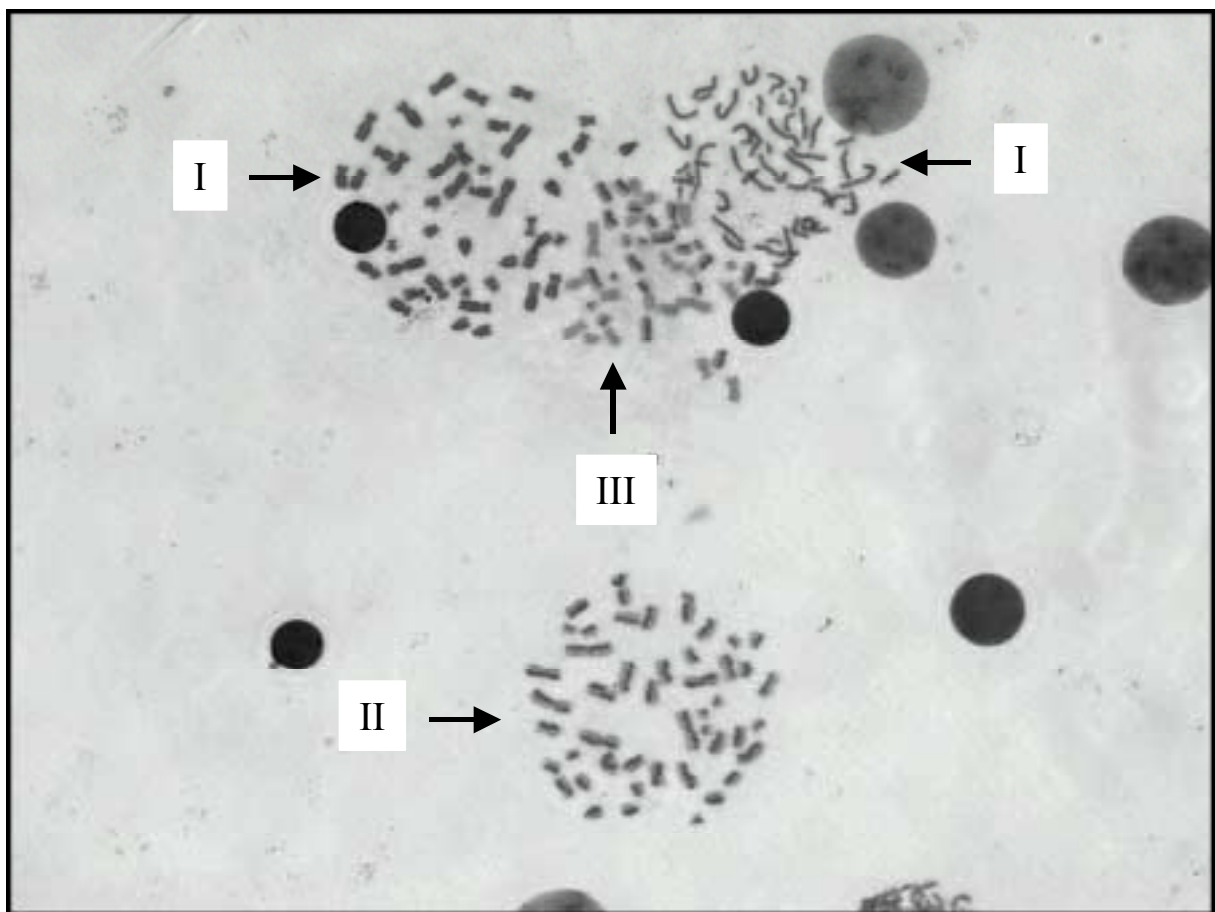


Abbildung 3.2: Unterscheidung von Metaphasen in der 1., 2. und 3. Mitose nach BrdU-Zugabe mit Hilfe der FPG-Färbung. Chromatiden von Metaphasen in der 1. Mitose (I) sind zu 100%, in der 2. Mitose (II) nur zu 50% und in der 3. Mitose (III) weniger als 50% dunkel gefärbt. Vergrößerung ca. 600fach (Chromosomenpräparat von unbestrahlten PBLs von Spender 2, 72h nach Stimulierung).

Bei Metaphasen in der zweiten Mitose nach BrdU-Zugabe ist eine Chromatide hell und eine dunkel gefärbt. Durch Chromatidaustausche zwischen Schwesterchromatiden kommt es in diesen Zellen zu typischen „Harlekin-Mustern“ (Abbildung 3.3). Metaphasen der dritten bzw. höheren Mitose nach Bestrahlung zeigen geringere Anteile (< 50%) an dunkel gefärbten Chromatidabschnitten (Abbildung 3.2).

Für die differenzielle Färbung wurden die Chromosomenpräparate für eine Stunde mit Bisbenzimid (Hoechst 33258) 1-5µg/ml in MilliQ lichtgeschützt in speziellen Färbetrögen gefärbt, anschließend zweimal in MilliQ gewaschen und luftgetrocknet. Die Präparate wurden mit dem Bestrahlungspuffer (19,45ml 0,2M Na₂HPO₄ + 0,55ml 0,1M Zitronensäure) überschichtet, mit einem Deckglas abgedeckt und eine Stunde unter einer UV-Lampe (360nm) bestrahlt. Der Abstand von Objektträger zur Lampe betrug ca. 5cm. Die Präparate wurden zweimal in MilliQ gewaschen, getrocknet und für 30min im Wasserbad in 2 x SSC (pH 7,5) bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden sie erneut zweimal in MilliQ gewaschen und mit Giemsa gefärbt (Kapitel 3.10.), luftgetrocknet und mit Eukitt eingedeckt. Chromosomenschäden wurden nur in den ersten und zweiten Mitosen ausgewertet.

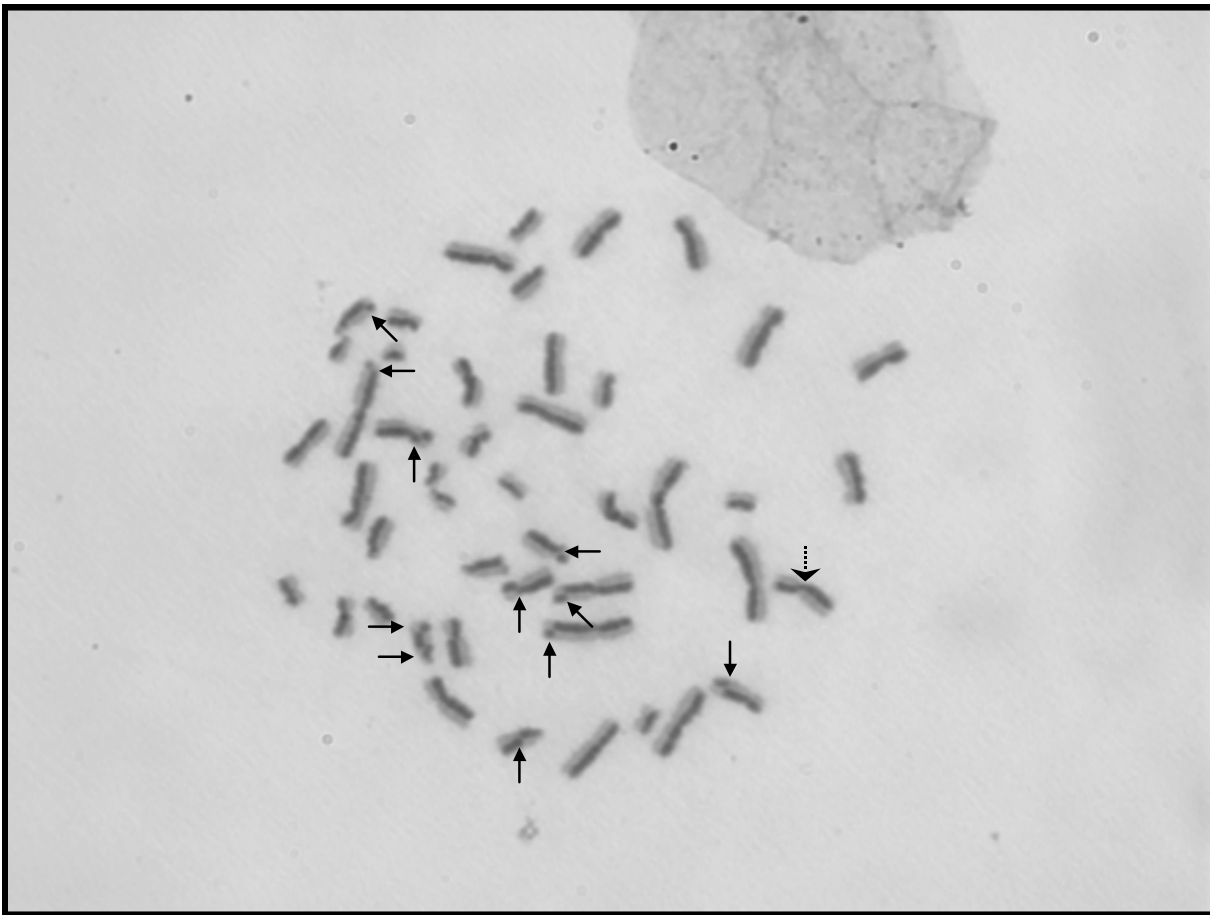


Abbildung 3.3: Metaphase in der 2. Mitose nach Stimulation. SCEs sind mit einem durchgezogenen Pfeil mit kleiner Spitze markiert. Eine Drehungen der Arme eines Chromosoms am Zentromer hingegen mit einem unterbrochenen Pfeil mit großer Spitze. Vergrößerung ca. 1500fach (Chromosomenpräparat eines ungeschädigten PBLs von Spender 2, 60h nach Stimulierung).

3.13. Auswertung der Chromosomenschäden in FPG-Präparaten

Die eingedeckten Chromosomen-Präparate wurden mit einem Mikroskop der Firma Leica (Typ DMRB) bei 1000facher Vergrößerung analysiert. Es wurde angestrebt pro Dosis und Zeitpunkt jeweils 100 erste und zweite Mitosen auszuwerten. Der Anteil aberranter Zellen, die Anzahl der verschiedenen Aberrationstypen, der prozentuale Anteil an Zellen in der Mitose bezogen auf die Gesamtzellzahl (Mitoseindex, MI), sowie der prozentuale Anteil an Metaphasen in der 1., 2. und ≥ 3 . Mitose nach Bestrahlung wurde bestimmt und in den Tabellen von Kapitel 7.3 aufgelistet.

In den Metaphasen der zweiten Mitose nach Bestrahlung wurde darüber hinaus die Anzahl an SCEs (Schwesterchromatidaustausche, „sister chromatid exchanges“), d.h. die Austausche zwischen der hellen und der dunklen Schwesterchromatide eines Chromosoms bestimmt (Kapitel 3.12.). Als SCEs wurden alle Austausche zwischen den Schwesterchromatiden gewertet mit Ausnahme von Austauschen unmittelbar an der Zentromerregion, da solch ein Austausch auch durch eine Drehung eines der Arme des Chromosoms am Zentromer zu Stande kommen kann (Abbildung 3.3). Es wurden 1000 Chromosomen (etwa 25 Metaphasen) pro Probe ausgewertet.

Die Aberrationen in den FPG-Präparaten wurden nach Savage (1975) klassifiziert und entsprechend der ISCN („international system for human cytogenetic nomenclature“) abgekürzt (ISCN, 1978). Da sich die für die Bestrahlung verwendeten PBLs zum Zeitpunkt der Bestrahlung stets in der G_0 -Phase befanden, führen induzierte Doppelstrangbrüche nach Fehlreparatur zu Chromosomen-Typ-Aberrationen (alle Aberrationstypen in Abbildung 3.4 außer Chromatidbruch). Nicht oder fehlerhaft reparierte Einzelstrangbrüche führen hingegen zu Chromatidschäden. Die verschiedenen Aberrationen werden im Folgenden näher erläutert und sind schematisch in Abbildung 3.4 dargestellt.

Zu den intra-chromosomalen Aberrationen zählen die Chromatidbrüche, die Chromosomenfragmente, die azentrischen Ringe, die zentrischen Ringe und die perizentrischen Inversionen. Letztere wurden nicht ausgewertet, da nur ein geringer Anteil von ihnen mit Hilfe der FPG-Färbung detektiert werden kann.

Chromatidbrüche (ctb) entstehen durch spontan- bzw. strahleninduzierte Einzelstrangbrüche sowie alkalilabile Läsionen in der G_0/G_1 -Phase, die nicht repariert wurden oder durch spontaninduzierte Doppelstrangbrüche in der G_2 -Phase. Durch Radikale oder die Verwendung von Colcemid usw. können solche DNA-Schäden entstehen, sie sind jedoch relativ selten. Als Chromatidbruch wurde gewertet, wenn der Abstand zwischen Bruchstück und Chromatide größer als der Durchmesser der Chromatide war. Kleinere Lücken, sogenannte „gaps“, kommen durch Unterschiede in der Anfärbbarkeit der DNA (achromatische Läsionen) zu Stande und wurden nicht als Aberration gewertet. Durch eine fehlerhafte Reparatur von Chromatidbrüchen in unterschiedlichen Chromosomen entstehen Chromatidaustauschaberrationen (cte). Dieser Aberrationstyp gehört somit zu den inter-chromosomalen Aberrationen, da er aus Chromatidbrüchen hervorgeht, wird er an dieser Stelle aufgeführt (nicht in Abbildung 3.4 dargestellt).

Chromosomenfragmente (csb) kommen durch Doppelstrangbrüche in der G_0/G_1 -Phase zu Stande. Sie entstehen aus nicht reparierten terminalen Deletionen oder durch die Verknüpfung von azentrischen Bruchstücken.

	NORMAL	CHROMATID BRUCH ctb	CHROMOSOMEN FRAGMENT csb	A-ZENTRISCHER RING ar	ZENTRISCHER RING MIT FRAGMENT r	PERI-ZENTRISCHE INVERSION
INTRA-CHROMOSOMAL						
INTER-CHROMOSOMAL	NORMAL	DIZENTRISCHES UND FRAGMENT dic		REZIPROKER AUSTAUSCH (nicht sichtbar)		

Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der in Metaphasepräparaten auftretenden Aberrationstypen in Anlehnung an Evans et al. (1974) und deren Abkürzungen (ISCN, 1978). Da reziproke Austausche nach FPG-Färbung nicht sichtbar sind und perizentrische Inversionen nur dann wenn das entstandene Chromosom eine atypische Struktur aufweist, wurden diese Aberrationstypen nicht ausgewertet und sind hier nur der Vollständigkeit halber dargestellt.

Interstitielle Deletionen (nicht in Abbildung 3.4 dargestellt) und azentrische Ringe (ar) werden in der vorliegenden Arbeit zusammengefasst und als dmin („double minutes“) bezeichnet, da sie auf identische Schäden zurückzuführen sind und sich nur in ihrer Größe unterscheiden. Sie entstehen durch zwei Doppelstrangbrüche auf einem Chromosomenarm (intrachromosomale Deletion), wobei die interstitiellen Deletionen, bedingt durch die Kürze der Bruchstücke, nicht als ein Paar Ringe erscheinen, sondern als kleine runde Fragmentenpaare. Sie sind in ihrer Anzahl den azentrischen Ringen deutlich überlegen.

Zentrische Ringe (r) entstehen, wenn es zu jeweils einem Doppelstrangbruch auf den beiden Armen eines Chromosoms kommt und werden in der Regel von einem azentrischen Fragment begleitet (z.B. ein Chromosom mit zwei terminalen Deletionen, wo das zentrische Fragment zu einem Ring und die beiden Deletionen zu einem azentrischen Fragment verknüpft werden). Ein zentrischer Ring und ein azentrisches Fragment werden als eine Aberration gewertet.

Zu den inter-chromosomalen Aberrationen zählen di-, tri- und polyzentrischen Chromosomen sowie reziproke Austausche.

Dizentrische Chromosomen (dic) entstehen durch strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche in zwei Chromosomen. Hierbei werden jeweils die zentrischen und die azentrischen Bruchstücke verknüpft. Dieser Schaden wird als eine Aberration gewertet. Ein trizentrisches Chromosom (tri) mit zwei azentrischen Fragmenten wird als zwei dizentrische Chromosomen gewertet. Entsprechend werden auch polyzentrische Chromosomen mit ihren azentrischen Fragmenten in dizentrische Chromosomen umgerechnet.

Reziproke Austausche sind in der verwendeten Färbung nicht sichtbar. Sie kommen durch induzierte Doppelstrangbrüche in der G₀/G₁-Phase in zwei oder mehreren Chromosomen und deren anschließende Fehlreparatur zu Stande.

In einigen Metaphasen wurden vereinzelt sogenannte Telomerassoziationen gefunden, die typisch für Lymphozyten sind. Hierbei liegen die Telomere der beiden kurzen und langen Arme eines Chromosoms dicht bei denen eines oder mehrerer anderer Chromosomen. Es handelt sich jedoch nicht um eine Aberration und sie ist daher auch nicht in Abbildung 3.4 dargestellt.

Weiterhin wurde das Auftreten sogenannte „rogue cells“ dokumentiert (Abbildung 4.5). Bei „rogue cells“ handelt es sich um Zellen mit einer abnorm hohen Aberrationsrate. In Kontrollen wurden Zellen mit mehr als 5 Austauschaberrationen als „rogue cells“ gewertet (Neel, 1998). In bestrahlten Proben wurden Zellen nur dann als „rogue cells“ gewertet, wenn die Anzahl ihrer Aberrationen deutlich über dem Durchschnitt der jeweiligen Probe lag. Eine Abschätzung des prozentualen Anteils an „rogue cells“ war jedoch nicht möglich, da bei der Durchsicht der Präparate die Gesamtzahl der betrachteten Zellen bzw. Metaphasen nicht protokolliert wurde.

3.14. Bestimmung des Anteils proliferierender Zellen

Da für eine Metaphaseanalyse PBLs stimuliert werden müssen, ist es von Interesse ob sich die Bestrahlung auf die Proliferation bzw. Stimulation der Zellen auswirkt und wenn ja in welchem Umfang. Daher wurde der Anteil an proliferierenden Zellen mittels Antikörpermarkierungen bestimmt. Hierzu wurde der Ki67- bzw. der BrdU-Antikörper verwendet (z.B. Campana und Janossy, 1988).

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 1200Upm (250g) mit Bremse für 10min in einer Megafuge 1.0 bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Waschschrte und die Fixierung der Zellen wurde stets ein Volumen von 5ml der entsprechenden Lösung verwendet.

3.14.1. Nachweis der Expression des Antigens Ki67

In proliferierenden Zellen wird unter anderem das nukleäre Antigen Ki67 exprimiert (Charakterisierung in Gerdes et al., 1991). Untersuchungen zeigen, dass dieses Antigen aus zwei Polypeptidketten mit Molekulargewichten von 345 und 395kD besteht und es sich nicht um ein Histon-Protein handelt (Gerdes et al., 1991). Es kann mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Anti-Ki67 (Überblick in Gerdes et al., 1983) aus der Maus markiert und anschließend z.B. mit einem „Anti-Mouse Ig-Rhodamine“ oder „Anti-Mouse Ig-FITC“ detektiert werden. Die so markierten G₁-, S-, G₂- und M-Phase-Zellen können unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden und von den ruhenden Zellen (G₀-Phase-Zellen) unterschieden werden (Gerdes et al., 1984). Da die Konzentration des Antigens Ki67 während des Fortschreitens im Zellzyklus ansteigt, zeigen Zellen in der M-Phase die höchste Fluoreszenzintensität (Verheijen et al., 1989a, Verheijen et al., 1989b).

Die Antikörper für den Anti-Ki67-Test (Ki-S5) wurden von der Firma Boehringer Mannheim GmbH bzw. später Roche bezogen. Die Zellproben wurden zu unterschiedlichen Inkubationszeiten nach Bestrahlung aufgearbeitet. Das Volumen der Zellsuspension betrug nach der Zugabe der einzelnen Antikörperlösungen ca. 250µl.

Zunächst wurde die Zellsuspension aus den Zellkulturflaschen (12,5cm²) in Zentrifugenröhrchen (10ml) überführt und zweimal mit PBS (w/o) bei Raumtemperatur gewaschen und durch tropfenweise Zugabe von Methanol fixiert. Die Zellen wurden für 30min bei -20°C inkubiert, dann einmal mit PBT (PBS (w/o) + 0,1% BSA (w/v) + 1% Tween 20 (v/v)) gewaschen und entweder im Kühlschrank bei 4-8°C gelagert oder sofort in 50µl der Ki67-Antikörperlösung (Endkonzentration: 2µg/ml) für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBT gewaschen, in 50µl „Anti-Mouse Ig-Rhodamine bzw. FITC“ (Endkonzentration: 4µg/ml) für weitere 30min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut einmal mit PBT gewaschen. Die Zellen wurden mit Dapi (10ng/ml) 10min gegengefärbt, auf einen Objektträger getropft (23µl/Tropfen), mit einem Deckglas vorsichtig abgedeckt und schließlich unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (Kapitel 7.2.6.). Die Anzahl Ki67-positiver Zellen, die bei Verwendung eines mit Rhodamin markierten Zweitantikörpers rot bzw. bei Verwendung eines mit FITC markierten Zweitantikörpers grün unter dem Fluoreszenzmikroskop erscheinen, wurde bestimmt. Das prozentuale Verhältnis zur Gesamtzellzahl wurde errechnet. Die Gesamtzellzahl wurde durch Gegenfärbung mit Dapi, die eine Blaufärbung der Zellkerne zur Folge hat, ermittelt.

Die Zellen wurden meist nach der Fixierung mit Methanol für einige Tage bei ca. 4°C im Kühlschrank in PBT gelagert. Dies war nötig, da während den Experimenten nicht ausreichend Zeit für die Markierung und Auswertung der Proben zur Verfügung stand.

3.14.2. Nachweis der BrdU-Inkorporation

Werden PBLs stimuliert und kontinuierlich in BrdU-haltigem Zellkulturmedium kultiviert, so kommt es während der Replikation zu einer Inkorporation von BrdU in die zelluläre DNA (Kapitel 3.12.). Mit Hilfe eines BrdU-Antikörpers können Zellen, die die DNA-Replikation in der 1. S-Phase nach Inkubation bzw. Stimulierung oder eine spätere Zellzyklusphase erreicht haben, von unmarkierten Zellen in der G₀-oder G₁-Phase noch vor der ersten DNA-Replikation nach Stimulierung unterschieden werden. Hierzu wurde der „5-Bromo-2'-deoxyuridine Labeling and Detection Kit I“ der Firma Roche verwendet. Anstelle des im BrdU-Test enthaltenen Waschpuffer wurde auch PBS mit 0,02% Tween20 und 0,002% BSA zum waschen der Zellen verwendet.

Die Zellsuspension wurde zunächst aus den Zellkulturflaschen (12,5cm²) in 10ml Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal mit PBS (w/o) bei Raumtemperatur gewaschen. Die Zellen wurden für mindestens 20min jedoch maximal 1h bei -20°C in 50mM Glycin in Ethanol fixiert. Die PBLs wurden zweimal mit Waschpuffer gewaschen und meist für einige Zeit im Kühlschrank bei ca. 4-8°C gelagert oder unmittelbar in 50µl BrdU-Antikörperlösung (aus der Maus), die stets kurz vor Gebrauch durch eine 1:10 Verdünnung der Stammlösung mit Inkubationspuffer hergestellt wurde, für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die PBLs zweimal mit Waschpuffer gewaschen und in 50µl Anti-Maus-FITC-Antikörper (Endkonzentration: 4µg/ml) 30min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden erneut einmal mit Waschpuffer gewaschen, 10min mit Dapi (10ng/ml) bei Raumtemperatur gegengefärbt, noch einmal mit Waschpuffer gewaschen, auf Objektträger getropft, mit einem Deckglas vorsichtig abgedeckt und unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Zellen die bereits BrdU in ihre DNA eingebaut hatten waren mit FITC markiert und deren Zellkerne zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Grünfärbung. Die Gesamtzellzahl wurde durch die Gegenfärbung mit Dapi, die eine Blaufärbung der Zellkerne zur Folge hat, ermittelt.

3.15. Apoptosemessung

Strahleninduzierte DNA-Schäden können zum programmierten Zelltod führen, der sogenannten Apoptose (Überblick in Kerr et al., 1972 und Krauss, 1997). Die Apoptose ist ein „Selbstmordprogramm“, das innerhalb weniger Stunden die betroffene Zelle vollständig in kleinere Kompartimente mit einer intakten Zellmembran zerlegt, den apoptotischen Körperchen. In vivo werden diese apoptotischen Körperchen von phagozytierenden Zellen aufgenommen und somit ohne lokale Entzündungsreaktion eliminiert. Dies ist einer der Unterschiede zu einer anderen Art des Zelltodes, der Nekrose. Weiterhin wird die Apoptose nicht wie die Nekrose durch externe Stimuli (Virusbefall, Gifte, mechanische Schäden usw.) ausgelöst, sondern durch interne Stimuli, wie z.B. strahleninduzierte DNA- bzw. Chromosomenschäden (Kern et al., 1999). Auch betrifft die Apoptose stets Einzelzellen und nicht ganze Zellverbände, wie es bei der Nekrose der Fall ist. Da der Ablauf der Apoptose von charakteristischen Veränderungen der Zellmorphologie begleitet wird, läßt sie sich durch geeignete Nachweismethoden vom nekrotischen Zelltod (Nekrose) unterscheiden.

Zur Messung der Apoptose in den PBLs wurden zwei Methoden angewandt. Der ApoNexin Apoptose-Test der Firma Oncor und der „Cell Death Detection Elisa^{PLUS}“ der Firma Roche.

3.15.1. ApoNexin-Test

Der ApoNexin-Test beruht auf der hohen Bindungsaffinität von Annexin V, einem Ca^{2+} -abhängigen, phospholipidbindenden Protein, zu Phosphatidylserin (PS). In einer gesunden Zelle herrscht eine Asymmetrie bezüglich der Phospholipide auf beiden Seiten der Zellmembran. Auf der Innenseite befinden sich anionische Phospholipide wie PS, während auf der Membranaußenseite neutrale Phospholipide überwiegen. Während der Apoptose verändert sich diese Asymmetrie, da PS auf die Membranaußenseite verlagert wird. Annexin V ist somit sehr gut geeignet, die Translokation von PS während des apoptotischen Prozesses auf die Membranaußenseite zu dokumentieren, wenn es mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wird (Vermes et al., 1995; Louagie et al., 1998a).

Da durch die Veränderung der Zellmembran bei nekrotischen Zellen Annexin in die Zellen eindringen kann und dort auf der Membrannnenseite an PS bindet, ist zur Abgrenzung der Apoptose gegenüber der Nekrose eine Gegenfärbung mit Propidiumjodid (PJ) notwendig. Zellen mit einer wie in der Nekrose geschädigten Membran lagern PJ in den Zellkern ein und sind damit in einer Doppelfluoreszenz (z.B. mit FITC-markiertem Annexin) gegenüber den einfach gefärbten apoptotischen Zellen zu erkennen. Jedoch sind auch spätapoptotische Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop PJ positiv, da auch bei diesen Zellen die Zellmembran nicht mehr intakt ist.

Bei allen Zentrifugationsschritten wurde die Megafuge 1.0 ohne Bremse verwendet, um eine Schädigung der Zellmembran durch auftretende Scherkräfte zu minimieren. Die Zentrifugationszeiten betragen stets 10min bei 1200Upm (250g). Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden gekühlt verwendet, um ein Fortschreiten der Zellen in der Apoptose zu unterbinden.

Die Zellsuspension wurden zunächst aus den Zellkulturflaschen ($12,5\text{cm}^2$) in Zentrifugenröhrchen überführt, falls sie nicht bereits in Zentrifugenröhrchen kultiviert wurden. Nach Zentrifugation, Entfernen des Kulturmediums und Resuspendierung des Zellpellets, wurden die PBLs einmal mit PBS (w/o) und ein weiteres Mal mit PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen. Das Zellpellet wurde in „Binding Buffer“ (1x) resuspendiert und eine

Konzentration von 10^5 - 10^6 Zellen/ml eingestellt. Es wurden 490µl Zellsuspension mit 5µl „ApoNexin FITC“-Lösung (100x) und 5µl Propidiumjodid-Lösung (100x) gemischt und im Kühlschrank (4-8°C) für 15 min inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS (w/o) gewaschen und anschließend mit 1µg/ml Bisbenzimid (Hoechst 33342) gegengefärbt. Anschließend wurden die Zellen noch einmal mit PBS (w/o) gewaschen, die Zellsuspension (23µl/Tropfen) auf Objektträger aufgetropft, vorsichtig mit einem Deckglas bedeckt und die PBLs mit Öl unter einen Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3.15.2. CDD-ELISA^{PLUS}

DNA-Fragmentierung stellt einen typischen biochemischen Prozess dar, der sowohl während des apoptotischen als auch des nekrotischen Zelltodes auftritt. Der Nachweis von Mono- und Oligo-Nukleosomen im Zellüberstand gibt Auskunft über den Umfang der Nekrose bzw. späten Apoptose, da in beiden morphologischen Prozessen die Zellmembran bereits geschädigt ist und Nukleosomen in das Zellkulturmedium gelangen. Um den Umfang der früh-apoptotischen Zellen abschätzen zu können, deren Zellmembran noch intakt ist, müssen die Zellen zunächst lysiert werden, um die Bindung der Mono- und Oligo-Nukleosomen an den Antikörper zu gewährleisten.

Der „Cell Death Detection ELISA^{PLUS}“ von Roche beruht auf einem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip, wobei freigesetzte Nukleosomen in Zellüberständen bzw. Lysaten nachgewiesen werden können. Den Kulturüberständen wird ein Gemisch von biotin-konjugierten Anti-Histon-Antikörpern und peroxidase-konjugierten Anti-DNA-Antikörpern zugegeben (Abbildung 3.5). Es entsteht ein Immunkomplex, der über die Biotin-Gruppen der Anti-Histon-Antikörper an die Mikrotiterplatte koppelt. Eine erfolgte Bindung wird über die Aktivität der Peroxidase nachgewiesen, welche an die Anti-DNA-Antikörper konjugiert ist. Durch Zugabe des Enzymsubstrates (ABTS Substrat) findet eine Farbreaktion statt, die in einem Photometer quantifiziert werden kann.

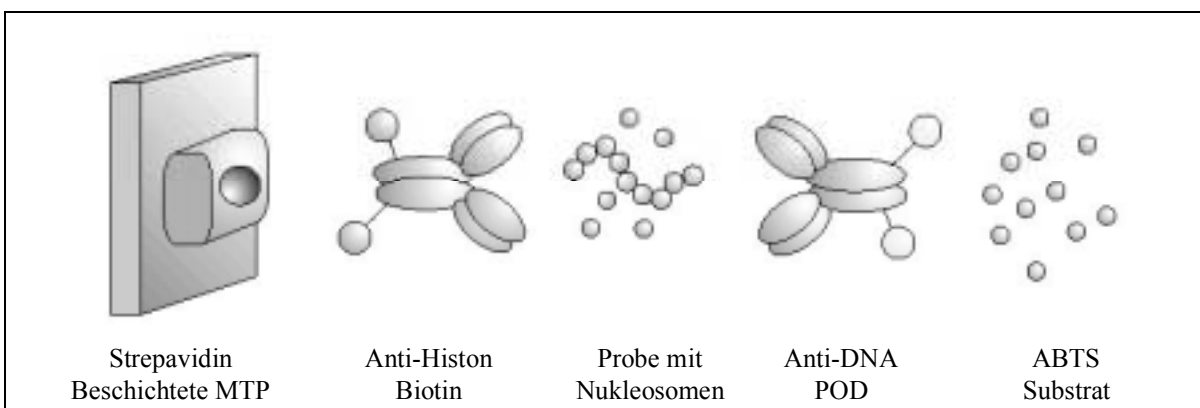


Abbildung 3.5: Testprinzip des „Cell Death Detection ELISA^{PLUS}“ von Roche (ABTS: 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline-sulfonate (6)]; MTP: Mikrotiterplatte; POD: Peroxidase).

Für die Messung der Apoptose bzw. Nekrose mittels CDD-ELISA^{Plus} wurden PBLs in Zentrifugenröhrchen (10ml) kultiviert. Die Zellzahl der Zellsuspension wurde unmittelbar vor dem Aufarbeiten der Probe bestimmt. Es wurden nun für die Zellyse 1×10^4 Zellen in eine Rundboden-Mikrotiterplatte (MTP) mit 96 Vertiefungen pipettiert und mit Medium I auf ein Gesamtvolumen von 200µl pro Vertiefung aufgefüllt. Pro Probe wurden jeweils drei Vertiefungen gefüllt, da im anschließenden „Elisa-Assay“ eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt wurde. Die Zellsuspensionen in der MTP wurden mit Hilfe einer Mikrotiterschaukel (Heraeus, B2127) in der Megafuge 1.0 für 10min bei 1100Upm (200g)

zentrifugiert. Da neben der Apoptose auch die Nekrose untersucht wurde, wurden die Überstände (ca. 180µl) vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Eppendorf-Röhrchen wurden im Kühlschrank (4-8°C) bzw. für die Langzeitlagerung im Gefrierschrank (-20°C) gelagert. Die Zellpellets wurden nun in 200µl Lysispuffer resuspendiert und für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Lysate in der MTP erneut für 10min bei 1100Upm zentrifugiert. Die Überstände (ca. 180µl) wurden vorsichtig mit einer Pipette in Eppendorf-Röhrchen überführt und ebenfalls im Kühlschrank bzw. im Gefrierschrank gelagert. Beim Abnehmen der Überstände wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Pellets nicht gelöst wurden, da die in ihnen enthaltenen Zellkerne unfragmentierte DNA enthalten, die die spätere Messung beeinflussen würde.

Zum Messen der Apoptose bzw. Nekrose wurden die Proben nun auf eine mit Streptavidin beschichtete MTP pipettiert, die im Lieferumfang enthalten ist.

Die MTP wurde mit je 20µl der folgenden Proben belegt:

- Zur Bestimmung der Nekrose: Kulturüberstände nach Zentrifugation (Dreifachbestimmung)
- Zur Bestimmung der Apoptose: Lysate der Proben (Dreifachbestimmung)
- Positivkontrolle (Doppelbestimmung)
- Inkubationspuffer (Doppelbestimmung)

Durch eine enzymatische Umsetzung der ABTS-Lösung durch die Peroxidase kommt es zu einer Verfärbung der Probe. Eine Farbreaktion der Positivkontrolle stellt sicher, dass die Methode korrekt durchgeführt wurde, auch wenn in den Testproben keine Verfärbung sichtbar wird. Da das Immunreagenz zu 90% aus Inkubationspuffer besteht (Tabelle 3.2), wurde zur Kontrolle des Hintergrundes eine Doppelbestimmung des Puffers vorgenommen. Zusätzlich wurde eine Vertiefung abgeklebt und vor der Messung mit dem Elisa-Reader mit ABTS-Lösung (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline-sulfonate (6)]) gefüllt, um eine Erhöhung der OD durch die ABTS-Lösung ausschließen zu können. In jede Vertiefung wurden nun 80 µl frisch angesetztes Immunreagenz (Tabelle 3.2) zugegeben, mit Ausnahme der abgeklebten Vertiefung in die später ABTS-Lösung gefüllt wurde. Die MTP wurde mit einer selbstklebenden Folie bedeckt und unter leichtem Schütteln (300Upm) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung sorgfältig durch Ausklopfen der MTP entfernt und jede Vertiefung 3 x mit 250 – 300µl Inkubationspuffer gespült. In jede Vertiefung wurden 100µl ABTS-Lösung pipettiert und die Proben auf einem MTP-Schüttler bei 250Upm inkubiert, bis die Farbentwicklung für eine photometrische Analyse ausreichte (nach etwa 3 – 10min). Die Messung wurde in einem Elisa-Reader der Firma BIO-TEK bei einer Wellenlänge von 405nm durchgeführt, wobei die Referenzwellenlänge 490nm entsprach.

Reagenzien	Zusammensetzung
Inkubationspuffer	90%
Anti-Histon-Biotin	5%
Anti-DNA-Peroxidase (POD)	5%

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des Immunreagenzes für den „Cell Death Detection ELISA^{Plus}“.

Zur Darstellung der erhaltenen OD-Werte im Ergebnisteil (Kapitel 4) wurden die OD-Werte der bestrahlten Proben auf die der Kontrollen, wie in Formel 3.1 dargestellt, normiert.

Formel 3.1:

$$\text{normierter Datenwert} = \frac{\text{OD Probe}}{\text{OD Kontrolle}}$$

3.16. Fehlerrechnung und Kurvenanpassung

Der Fehler des Mitoseindex, des prozentualen Anteils an stimulierten Zellen (Ki67-Test und Anti-BrdU-Test) und des Anteils an apoptotischen Zellen (ApoNexin-Test) wurde mit Formel 3.2 berechnet.

Formel 3.2:

$$\Delta X = \Delta \left(\frac{X}{N} \right) = \frac{\sqrt{N \times p \times (1-p)}}{N}$$

ΔX = Fehler
 N = Gesamtzellzahl
 p = Wahrscheinlichkeit des Ereignisses
 (z.B. Auftreten einer Mitose oder einer markierten Zelle)

Der Fehler bei der Anzahl an Chromosomenaberrationen und der Anzahl an zusätzlichen Fragmenten (PCC-Methode) wurde nach Formel 3.3 bestimmt.

Formel 3.3:

$$\Delta X = \sqrt{N}$$

N = Datenwert
 ΔX = Fehler

Die Standardabweichung (SD; Formel 3.4) wurde dann berechnet, wenn ein Mittelwert mehrerer Datenpunkte angegeben wurde, wie z.B. bei der Bestimmung der Apoptose mittels CDD⁺-ELISA.

Formel 3.4:

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \times \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

n = Anzahl an Datenwerten
 SD = Standardabweichung
 \bar{x} = Mittelwert
 x_i = Datenwert

Die Dosis-Effekt-Kurven von Chromosomenaberrationen in Metaphasezellen können durch eine linear-quadratische Beziehung hinreichend genau beschrieben werden:

Formel 3.5:

$$y = C + \alpha D + \beta D^2$$

C = spontane Aberrationsrate in den Kontrollen

D = Dosis (Gy)

y = Anzahl an Aberrationen

α = Anfangssteigung der Kurve (Gy^{-1})

β = Zunahme der Kurvensteigung (Gy^{-2})

Die Dosis-Effekt-Kurven von zusätzlichen Fragmenten in G_0 -Phase-Zellen (PCC-Daten) können durch eine lineare Beziehung beschrieben werden:

Formel 3.6:

$$y = \alpha D$$

D = Dosis (Gy)

y = Anzahl zusätzlicher Fragmente

α = Anfangssteigung der Kurve (Gy^{-1})

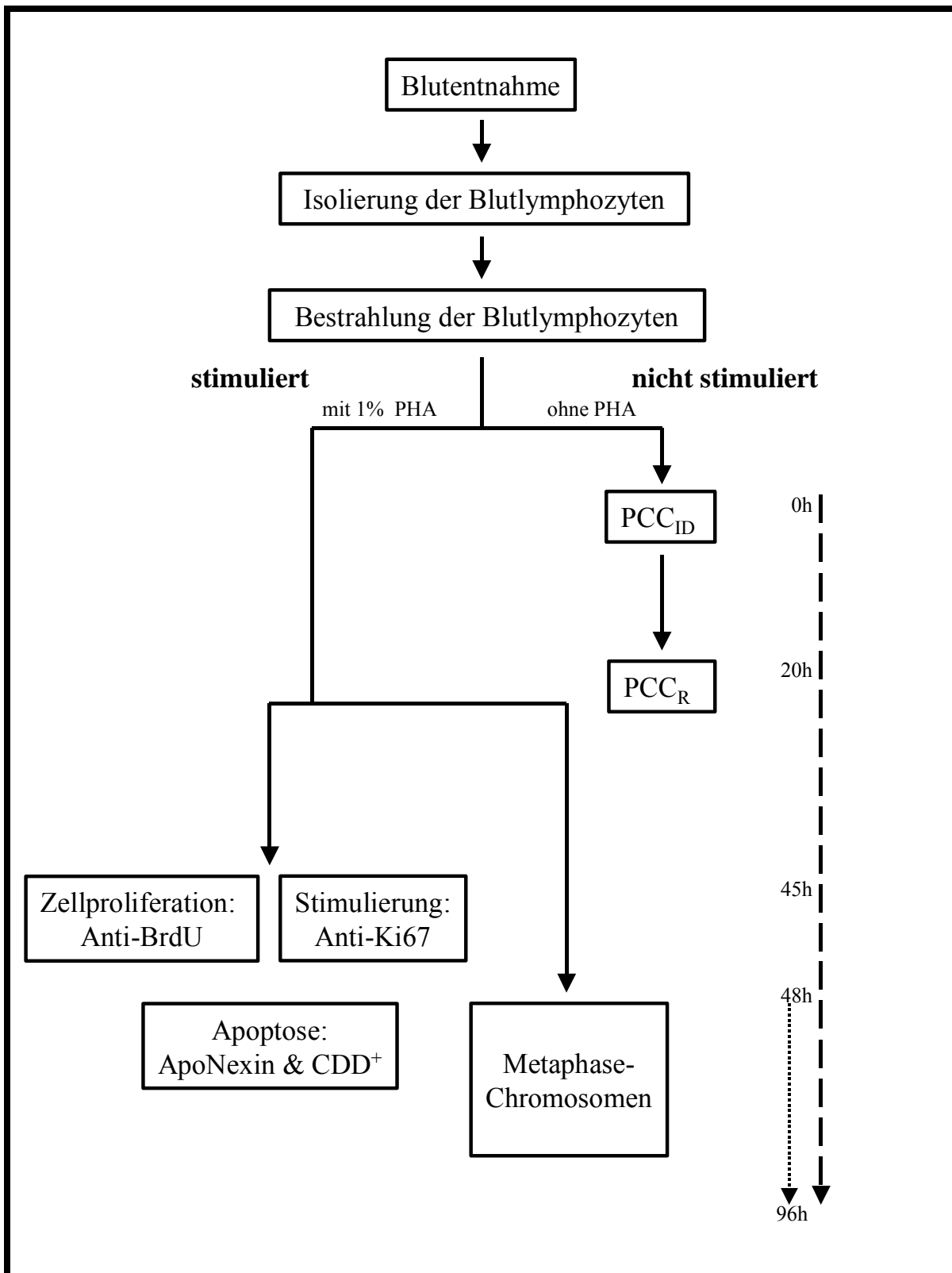


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des Experimentenablaufes, der verwendeten Methoden und der Zeitpunkte der Probenahme (ID: Initialschaden; PCC: „Premature Chromosome Condensation“; PHA: Phythämagglutinin; R: Reparatur).

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde für 2 Blutspender die Induktion von Chromosomenschäden in peripheren Blutlymphozyten als Funktion vom Dosis- und Zeitintervall nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, 100MeV/u (LET = 28keV/ μ m) und 400MeV/u Kohlenstoffionen (LET = 11keV/ μ m) untersucht. Veränderungen in der Proliferation und der Induktion von Apoptose wurden zusätzlich in PBLs von 3 weiteren Spendern bestimmt. Durch den Vergleich der Spender konnten individuelle Unterschiede (Inter-Donor-Effekte) gemessen werden die mit der zeitlichen Variabilität der einzelnen Spender (Intra-Donor-Effekt) verglichen wurden.

Im Folgenden wurden zunächst die Messungen der Chromosomenaberrationen dargestellt, dann der Einfluss auf den Mitoseindex sowie die Proliferation und die Induktion der Apoptose beschrieben.

Die Fehler der einzelnen Messwerte wurden, wie in Kapitel 3.16. beschrieben, berechnet. Die Fehlerbalken mancher Datenpunkte sind in einigen Abbildungen kleiner als die Symbole und werden in diesen Fällen nicht dargestellt.

4.1. Vorversuche zum Einfluss von BrdU auf die Messwerte

Um den Einfluß von BrdU zu untersuchen wurden unbestrahlte PBLs der Spender 1, 2 und 3 in zwei unabhängigen Experimenten ohne und mit BrdU (6 μ g BrdU pro ml Medium) über einen Zeitraum von 0 bis max. 122h inkubiert und zu mehreren Zeitpunkten die Entstehung von Chromosomenschäden in Metaphasezellen (Kapitel 3.13.), der Mitoseindex (Kapitel 3.13.), die Zellzahl (Kapitel 3.3.), die Induktion von Apoptose (Kapitel 3.15.1.) und die Stimulation der Zellen (Kapitel 3.14.1.) untersucht (Tabelle 4.1).

Experiment	Spender	Zeitpunkte der Probenahme zur Untersuchung von:				
		Chromosomen-schäden	Mitoseindex	Zellzahl	Apoptose	Stimulation
1	2 und 3	48, 56, 60, 72, 84h	48, 52, 56, 60, 72, 84h	21, 25, 45, 49, 52, 56, 60, 71, 84, 122h	21, 45, 71h	n.u.
2	1 und 3	48, 72h	48, 72h	45, 72h	n.u.	45h

Tabelle 4.1: Übersicht der Probenzeitpunkte zu denen der Einfluss von BrdU auf biologischen Messwerte in PBLs der Spender 1, 2 und 3 untersucht wurde. Die Konzentration an BrdU betrug in den unbestrahlten Proben stets 6 μ g pro ml Medium (n.u. = nicht untersucht).

In allen Untersuchungen konnte kein Einfluß von BrdU nachgewiesen werden, mit Ausnahme des Mitoseindex. Der prozentuale Anteil an Zellen in der Mitose bezogen auf die Gesamtzellzahl zeigte in den untersuchten Spendern beider Experimente ein geringfügig niedrigeres Niveau in den Proben mit BrdU, was auf eine geringe inhibitorische Wirkung von BrdU auf die Zellproliferation hinweist. Dieser Effekt konnte anhand der Zellzahl nicht bestätigt werden.

4.2. Chromosomenschäden in Metaphasezellen

Chromosomenaberrationen in Metaphasen wurden in PBLs der Blutspender 1 und 2 nach Röntgen- und 400MeV/u Kohlenstoffionenbestrahlung (LET = 11keV/μm) mit Dosen von 0 bis 4Gy ausgewertet. Chromosomenpräparate wurden im Zeitraum von 48 bis 96h hergestellt. Um eventuell vorhandene Intra-Donor-Unterschiede in den Spendern 1 und 2 erkennen zu können, wurde für beide Spender ein weiteres Röntgenexperimente durchgeführt und hierbei die Messung des 48h Punktes wiederholt. Da für die Abschätzung des Schadens von den einzelnen Arbeitsgruppen unterschiedliche Chromosomenaberrationen in die Auswertung mit einbezogen werden, wurden in Kapitel 7.3. die verschiedenen Aberrationstypen gesondert in Tabellenform aufgeführt. Zusätzlich wurde in diesen Tabellen der entsprechende Mitoseindex und der prozentuale Anteil der Metaphasen in der 1., 2. und ≥ 3 . Mitose nach Bestrahlung aufgeführt. Wird im Folgenden von Aberrationen gesprochen, so wird damit die Summe aller ausgewerteten Chromosomenschäden (Kapitel 3.13.) bezeichnet.

4.2.1. Chromosomenaberrationen in PBLs der 1. Mitose nach Bestrahlung (Spender 1 und 2)

Die Anzahl der Aberrationen in PBLs in der 1. Mitose nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und 400MeV/u Kohlenstoffionen für Spender 1 und 2 steigt mit zunehmender Strahlendosis an (Abbildung 4.1).

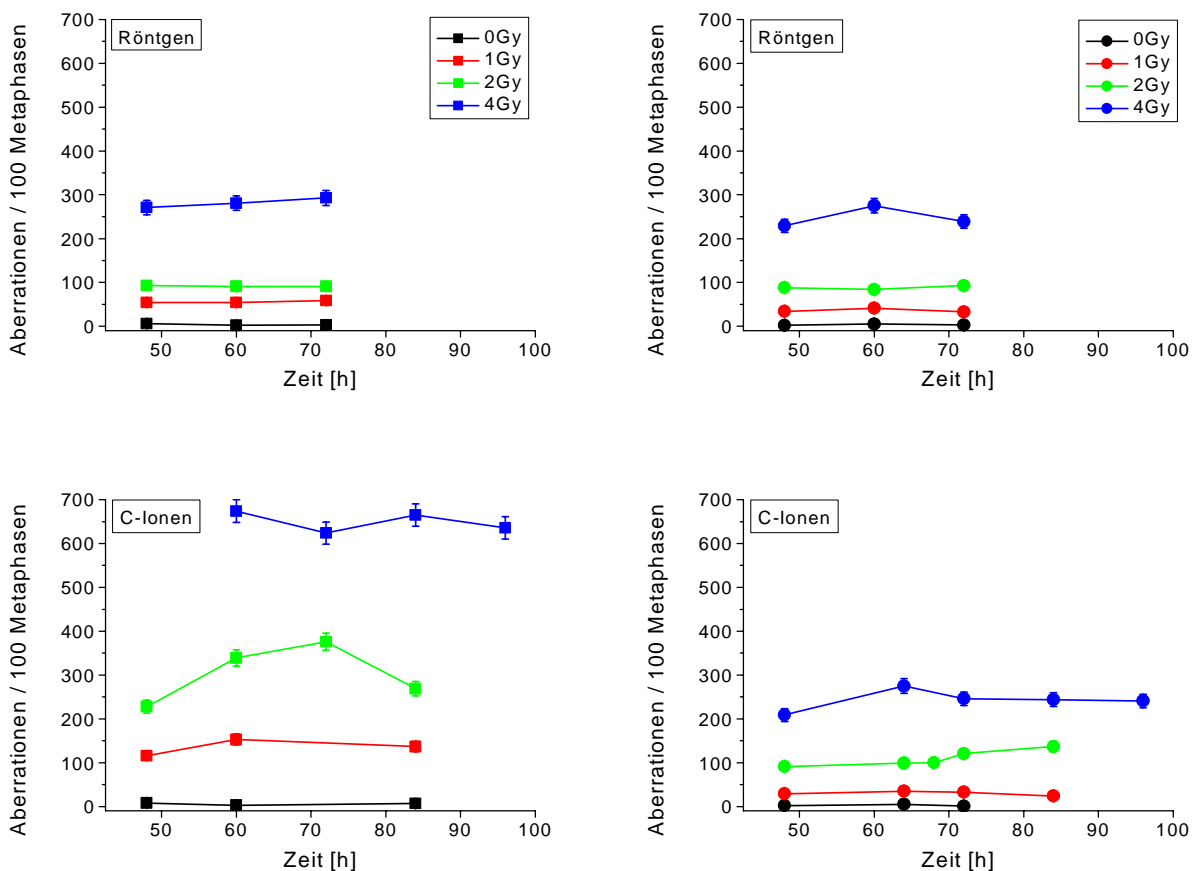


Abbildung 4.1: Aberrationen in 100 PBLs in der 1. Mitosen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen (oben) bzw. 400MeV/u Kohlenstoffionen mit einem LET von 11keV/μm (unten) für Spender 1 (links) und Spender 2 (rechts). Der Fehler wurde nach Formel 3.3 berechnet und als Fehlerbalken dargestellt.

Abbildung 4.1 zeigt darüber hinaus, dass für eine gegebene Dosis die Aberrationsrate nicht vom Untersuchungszeitpunkt abhängt (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.1 bis 7.6).

Der prozentuale Anteil an aberranten Zellen in der 1. Mitose nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung und 400MeV/u Kohlenstoffionen nimmt mit steigender Strahlendosis bei beiden Spendern zu (Abbildung 4.3). Ebenso wie bei der Aberrationsrate läßt sich jedoch keine Veränderung des prozentualen Anteils an aberranten PBLs über die Zeit erkennen (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.1 bis 7.6).

4.2.1.1. Intra-Donor-Effekte

Um zu überprüfen ob Intra-Donor-Effekte bei Blutspendern hinsichtlich strahleninduzierter Chromosomenschäden in Metaphasen der 1. Mitose nach Bestrahlung vorliegen, wurden für die Blutspender 1 und 2 ein weiteres Röntgenexperiment durchgeführt. Diese Experimente lagen im Fall von Spender 1 etwa 9 Monate auseinander und von Spender 2 etwa 4 Monate. Hierbei wurde jedoch nur die Anzahl der Aberrationen 48h nach Bestrahlung gemessen, da in den vorangegangenen Experimenten keine Unterschiede der Aberrationsrate hinsichtlich der Sammelzeitpunkte auftraten.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Anzahl an Aberrationen in 100 Metaphasen der 1. Mitose nach Röntgenbestrahlung der PBLs sowohl von Spender 1 (Abbildung 4.2, links) als auch für Spender 2 (Abbildung 4.2, rechts) bis zu einer Dosis von 2 Gy sehr dicht beieinander liegen. Nur bei einer Dosis von 4 Gy wird ein geringer Unterschied deutlich.

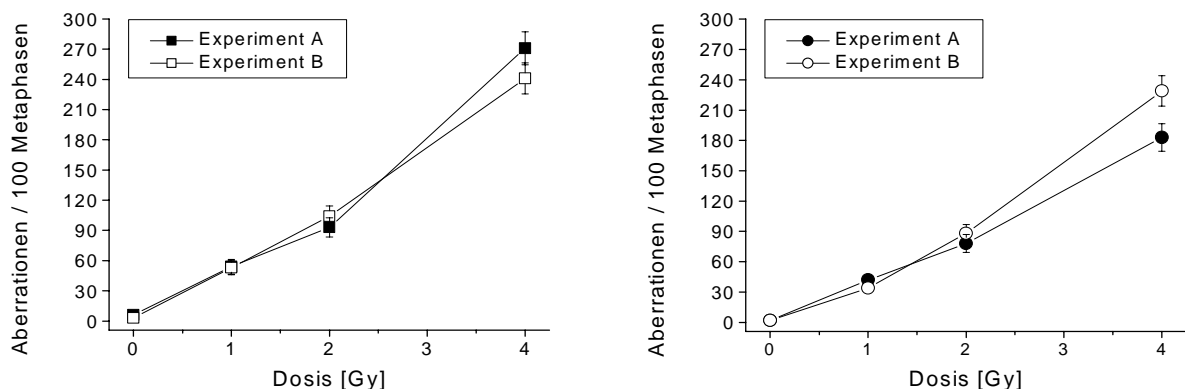


Abbildung 4.2: Aberrationen in PBLs in der 1. Mitose 48h nach Röntgenbestrahlung von Spender 1 (links) und Spender 2 (rechts). Die Experimente A und B lagen im Fall von Spender 1 etwa 9 Monate auseinander und von Spender 2 etwa 4 Monate. Der Fehler wurde nach Formel 3.3 berechnet und als Fehlerbalken dargestellt.

4.2.1.2. Inter-Donor-Effekte

Ein Vergleich der nach Bestrahlung erhaltenen Daten (Abbildung 4.1) zeigt, dass nach Röntgenbestrahlung beide Blutspender annähernd gleiche Aberrationsniveaus aufweisen, nur nach einer Dosis von 4Gy ist in Spender 1 ein gering höheres Level an Aberrationen im Vergleich zu Spender 2 zu erkennen (Abbildung 4.1, oben). Nach Bestrahlung mit 400MeV/u Kohlenstoffionen wird dagegen ein deutlicher Unterschied im Niveau der Aberrationsrate in PBLs der 1. Mitose beider Spender deutlich (Abbildung 4.1, unten), wobei die Daten für Spender 1 um den Faktor 2 bis 2,5 höher liegen als für Spender 2.

Dieser Unterschied wird auch beim Vergleich des prozentualen Anteils an aberranten Zellen deutlich. Da weder in Spender 1 noch 2 eine Zu- oder Abnahme des prozentualen Anteils an aberranten Zellen bei den verwendeten Strahlenarten über die Zeit beobachtet werden konnte

und auch die Röntgenexperimente A und B keine Unterschiede aufwiesen, wurde der Mittelwert aus Daten, die für die jeweilige Dosis zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen worden waren, berechnet. Mittelwerte sind in Abbildung 4.3 aufgetragen. Der prozentuale Anteil an aberranten Zellen ist nach Röntgenbestrahlung der PBLs beider Spender annähernd identisch (offene Symbole). Ähnliche Ergebnisse erhält man nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen für Spender 2, wobei die Daten für Spender 1 im Vergleich hierzu eine deutliche Erhöhung zeigen und nach einer Dosis von 4Gy ausschließlich aberrante Zellen vorhanden sind.

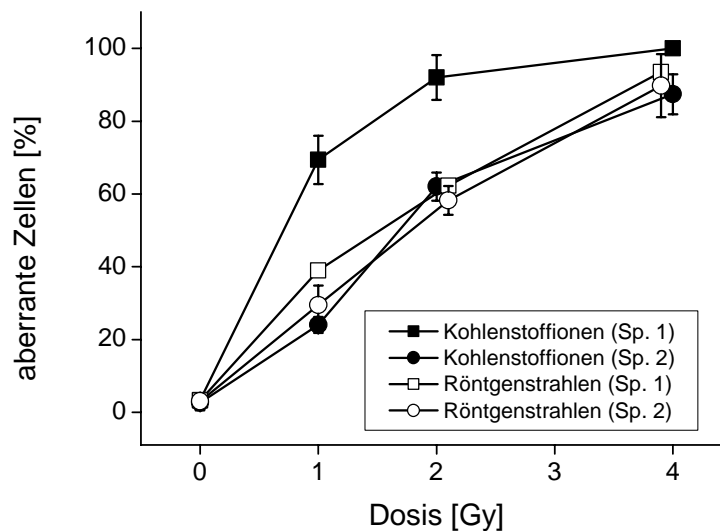


Abbildung 4.3: Mittelwerte des prozentualen Anteils an aberranten PBLs von Spender 1 und 2 nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen (offene Symbole) und 400MeV/u Kohlenstoffionen mit einem LET von 11keV/ μ m (geschlossene Symbole). Die Mittelwerte berechnen sich aus Daten, die für die einzelnen Dosen und Strahlenarten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung gesammelt wurden. Die Standardabweichung des Mittelwertes wurde nach Formel 3.4 errechnet und in Form von Fehlerbalken dargestellt.

4.2.2. Chromosomenaberrationen in PBLs der 2. Mitose nach Bestrahlung (Spender 1 und 2)

Um die Weitergabe von Aberrationen auf die Tochterzellen zu untersuchen wurden neben Chromosomenschäden in Metaphasen der 1. Mitose auch Schäden in Metaphasen der 2. Mitose nach Bestrahlung untersucht. Da es nach Bestrahlung nur zu wenigen Zeitpunkten möglich war, ausreichend 2. Mitosen, d.h. 50 bis 100 Metaphasen pro Probe, auszuwerten, wurden diese Daten nur tabellarisch (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.7 bis 7.10) und nicht graphisch dargestellt. Jedoch kommt es in allen Experimenten beim Übergang der PBLs von der 1. in die 2. Mitose nach Bestrahlung zu einer Reduktion der Anzahl von Aberrationen. Die Aberrationsrate vermindert sich dabei um 30 bis 70%, unabhängig von Spender, Strahlenart, Dosis oder Zeitpunkt der Aufarbeitung. Wie auch bei der Auswertung der Metaphasen der 1. Mitose nach Bestrahlung wird auch in den Metaphasen der 2. Mitose ein Anstieg sowohl der Aberrationsrate als auch des Anteils an aberranten Zellen mit steigender Dosis sichtbar. Ein Anstieg der Aberrationsrate oder des prozentualen Anteils an aberranten Zellen über die Zeit kann nicht beschrieben werden, wobei auch hier die geringe Anzahl der Datenpunkte eine Abschätzung erschwert.

4.2.2.1. Intra-Donor-Effekte

Die Untersuchung von Intra-Donor-Effekten hinsichtlich eines Unterschieds in der Aberrationsrate von Metaphasen in der 2. Mitose nach Röntgenbestrahlung der Spender 1 und 2 ist nicht möglich, da keine Daten aus zwei unabhängigen Experimenten für die beiden Spender vorliegen. Dies liegt daran, dass bei beiden Spendern bei jeweils einem der Röntgenexperimente nur Chromosomenpräparate zu einem Zeitpunkt, und zwar 48h nach Bestrahlung, angefertigt wurden. Zu diesem Zeitpunkt liegt der prozentuale Anteil an Metaphasen in der 2. Mitose nach Röntgenbestrahlung für Spender 1 (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.2; Experiment B) und Spender 2 (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.5; Experiment A) zwischen 0 und 5% und ist damit zu gering um eine statistisch signifikante Aussage zu machen.

4.2.2.2. Inter-Donor-Effekte

Bei der Untersuchung von Inter-Donor-Effekten zeigt sich in Metaphasen der 2. Mitose nach Bestrahlung die gleichen Tendenz wie in Metaphasen der 1. Mitose. Nach Röntgenbestrahlung ist die Aberrationsrate in Spendern 1 und 2 annähernd gleich (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.7 und 7.9). Nach Bestrahlung mit 400MeV/u Kohlenstoffionen liegt die Anzahl an Aberrationen in Metaphasen der 2. Mitose in Spender 1 um ca. den Faktor 2,5 höher als in Spender 2 (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.8 und 7.10). Diese Tendenzen treffen auch für den prozentualen Anteil an aberranten Zellen zu. Nach Röntgenbestrahlung ist kein signifikanter Unterschied erkennbar (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.7 und 7.9). Auch ist der prozentuale Anteil von aberranten Zellen in Metaphasen der 2. Mitose nach 400MeV/u Kohlenstoffionenbestrahlung für Spender 1 um einen Faktor von 1,5 bis 3 höher als in Spender 2 (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.8 und 7.10).

4.2.2.3. Anzahl an Schwesterchromatidaustauschen (SCEs) in Metaphasen der 2. Mitose nach Bestrahlung der PBLs von Spender 1 und 2

Die in Metaphasen der 2. Mitose nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und 400MeV/u Kohlenstoffionen gemessene Anzahl an SCEs in PBLs der Spender 1 und 2 zeigen geringe Schwankungen über die Zeit und Dosis (Kapitel 3.13.). Jedoch kann in keinem Experiment ein reproduzierbarer zeit- bzw. dosisabhängiger Anstieg oder Rückgang der Anzahl an SCEs festgestellt werden (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.7 bis 7.10). Die Anzahl an SCEs schwankt für Spender 1 nach Röntgenbestrahlung zwischen 5,8 bis 9,6 und für Spender 2 zwischen 6,6 bis 10,2 pro Metaphase. Nach Bestrahlung mit 400MeV/u Kohlenstoffionen liegen die Daten zwischen 7,1 und 10,3 für Spender 1 und zwischen 6,1 und 8,9 für Spender 2.

Intra-Donor-Effekte konnten, aus den in Kapitel 4.2.2.1. beschriebenen Gründen, nicht untersucht werden. Die Schwankungen in den Experimenten der Spender 1 und 2 hinsichtlich der Anzahl an SCEs sind zu groß um hier Inter-Donor-Effekte zu beschreiben.

4.3. Relative Biologische Wirksamkeit (RBW)

Um die biologische Wirkung einer Strahlenart abschätzen zu können wird ihre RBW bestimmt (Kapitel 2.5.; Formel 2.1). Hierzu wird der Quotient der Dosis einer Referenzstrahlung (250kV Röntgenstrahlung) und der einer Teststrahlung (z.B. 400MeV/u Kohlenstoffionen), die zum gleichen strahlenbiologischen Effekt führt, berechnet. Diese Berechnung kann für unterschiedlich hohe Schadensniveaus durchgeführt werden und wurde anhand der Kurven in Abbildung 4.4 vorgenommen. Bei den Kurven handelt es sich um einen polynomiellen Fit 2. Ordnung.

Die RBW von 400MeV/u Kohlenstoffionen für die Erzeugung von 100 bzw. 200 Aberrationen pro 100 Metaphasen in der 1. Mitose nach Bestrahlung wurde für Spender 1 und Spender 2 berechnet. Da 400MeV/u Kohlenstoffionen in Spender 1 eine höhere Aberrationsrate als gleiche Dosen Röntgenstrahlung aufweisen (Abbildung 4.4, links), wurde für Spender 1 ein RBW_{100} von 2,8 bzw. ein RBW_{200} von 2,3 bestimmt. Im Falle von Spender 2 liegen die Kurven für beide Strahlenarten aufeinander (Abbildung 4.4, rechts), somit beträgt der RBW-Wert 1 unabhängig vom Schadensniveau.

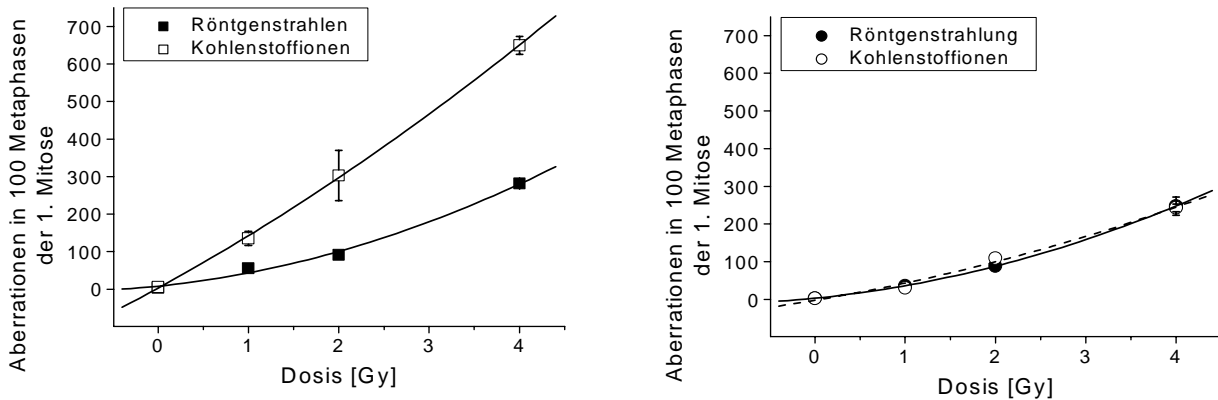


Abbildung 4.4: Aberrationen in 100 Metaphasen der 1. Mitose nach Röntgen- bzw. 400MeV/u Kohlenstoffionenbestrahlung (16keV/ μ m) der PBLs von Spender 1 (links) und Spender 2 (rechts). Aufgetragen ist der Mittelwerte \pm Standardabweichung (Kapitel 3.16.; Formel 3.4) für die einzelnen Dosen, der sich aus Ergebnissen, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung erhalten wurden, ergibt. Die Kurven konnten durch eine linear-quadratische Beziehung hinreichend genau beschrieben werden (Kapitel 3.16.; Formel 3.5).

4.4. Rogue Zellen

Im Rahmen der Untersuchung von Metaphasepräparaten wurde auch das Auftreten sogenannter „rogue cells“ dokumentiert (Abbildung 4.5). Bei der Untersuchung von PBLs der Spender 1 und 2 konnten, sowohl nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen als auch Kohlenstoffionen, diese schwergeschädigten Zellen nachgewiesen werden.

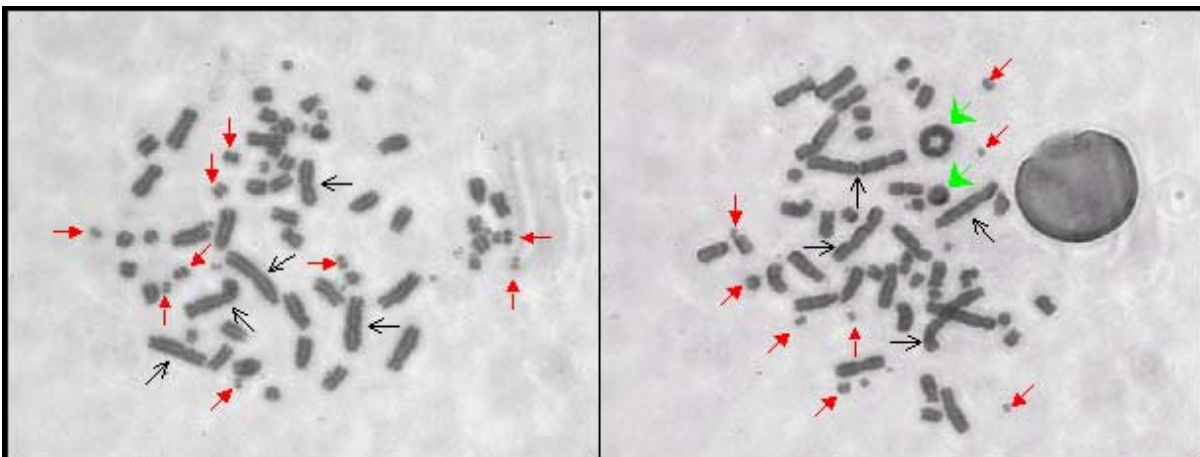


Abbildung 4.5: „Rogue“-Zellen mit mehreren Chromosomenschäden in Kontrollen von PBLs 72h nach Stimulierung (Spender 1). Einige der Aberrationen wurden mit Pfeilen markiert: Polyzentrische Chromosomen (schwarzer Pfeil), azentrische Fragmente (roter Pfeil) und zentrische Ringe (grüner Pfeil). Vergrößerung ca. 600fach.

Sie treten jedoch meist erst in Proben ab einer Inkubationszeit von mindestens 60h auf. Nur in einem Fall wurde bereits 48h nach Bestrahlung mit 400MeV/u Kohlenstoffionen eine „rogue cell“ in der Kontrolle von Spender 1 gefunden (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.3).

4.5. Chromosomenschäden in G_0 -Zellen von Spender 1 und 2

Da die Untersuchung von Metaphasepräparaten durch viele zytogenetische Faktoren, wie z.B. die Proliferation, Stimulation und Apoptose beeinflusst werden können, wurden zusätzlich DNA-Schäden in Interphasezellen untersucht. Hierzu wurden PBLs in der G_0 -Phase mit CHO-Metaphasen fusioniert. Diese Fusion wurde entweder unmittelbar nach der Bestrahlung der Zellen durchgeführt und somit der sogenannte Initialschaden (ID_{0h} ; „initial damage“) detektiert oder die Zellen wurden für 20h inkubiert und hatten dadurch die Möglichkeit DNA-Schäden zu reparieren (R; „repair“). Pro Probe wurden 40 bis 50 fusionierte Interphase-PBLs ausgewertet.

Die Erhöhung der Chromosomen- bzw. Fragmentenzahl in den bestrahlten G_0 -PBLs kommt durch strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) zu Stande. Der Zusammenhang zwischen der Erzeugung von strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen und der Erzeugung von zusätzlichen Fragmenten in PCC-Präparaten wird in der Diskussion näher erläutert. Die Anzahl zusätzlicher Fragmente pro Zelle stellt die Differenz der Anzahl an Fragmenten der bestrahlten Probe zur entsprechenden Kontrolle dar und wurde für PBLs der Spender 1 und 2 in Abbildung 4.6 nach Röntgenbestrahlung dargestellt. Es konnten keine Ergebnisse für die Reparatur in PCC-Chromosomen der PBLs von Spender 2 ermittelt werden, da die Fusionsrate nahezu null war, was auf einen Verlust der Metaphasen zurückzuführen ist, die nur in einer sehr geringen Anzahl in diesen Präparaten vorhanden waren.

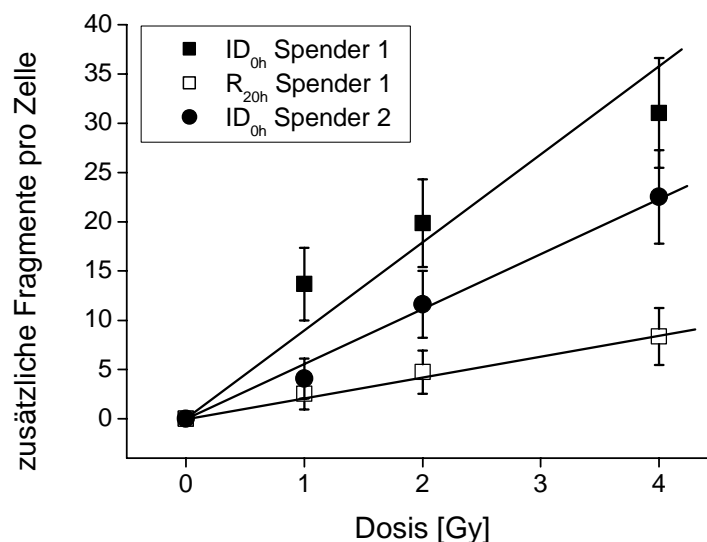


Abbildung 4.6: Anzahl an strahleninduzierten zusätzlichen Fragmenten pro Zelle in Spender 1 und 2 nach Röntgenbestrahlung mit Dosen von 0 bis 4Gy (Initialschaden ID_{0h} ; Restschaden nach Reparatur R_{20h}). Der Fehler wurde nach Formel 3.3 berechnet und als Fehlerbalken dargestellt. Die Datenwerte wurden durch eine lineare Beziehung beschrieben (Kapitel 3.16.; Formel 3.6).

In den PBLs der beiden Spendern wird sowohl im Initialschaden als auch in der Reparatur bei der Induktion von zusätzlichen Fragmenten ein Anstieg der Anzahl mit zunehmender Dosis deutlich. Zusätzlich läßt sich in PBLs von Spender 1 ein Rückgang der Anzahl zusätzlicher Fragmente von 8,8 zusätzlichen Fragmenten pro Gy nach 0h Inkubation (ID) auf 2,1 20h nach Bestrahlung (R) beobachten. Dies entspricht einer prozentualen Reduktion an zusätzlichen Fragmenten von ca. 75%.

Diese vorläufigen Messungen geben erste Hinweise auf den Initialschaden in PBLs der G₀-Phase. Aussagen über Intra-Donor-Effekte hinsichtlich der Erzeugung zusätzlicher Fragmente können nicht gemacht werden, da für keinen der Spender Daten aus mehreren unabhängigen Experimenten vorliegen.

Der Initialschaden (ID) in den PBLs von Spender 2 zeigt mit 5,4 zusätzlichen Fragmenten pro Gy eine geringere Anzahl im Vergleich zum Initialschaden von Spender 1 mit 8,8 zusätzlichen Fragmenten pro Gy. Das Schadensniveau liegt bei Spender 2 somit ca. 40% tiefer als in Spender 1.

4.6. Mitoseindex

Der Mitoseindex ist der prozentuale Anteil an mitotischen Zellen in der Gesamtpopulation und gibt Auskunft über die Proliferation einer Zellkultur. Der Mitoseindex wurde zusätzlich mit dem Anteil an Zellen in der 1. Mitose (Kapitel 4.7.) multipliziert und somit auch die Anzahl von Zellen in der 1. Mitose nach Bestrahlung berechnet. Zur Bestimmung des Mitoseindex wurden ca. 2000 Zellen pro Probe ausgewertet.

4.6.1. Strahlenbedingte Veränderungen in PBLs verschiedener Spender nach Bestrahlung

In Abbildung 4.7 wurde der Gesamtmitoseindex (links) von Spender 1 (oben) und Spender 2 (unten) 48 bis 96h nach Röntgenbestrahlung beispielhaft dargestellt (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.1 und 7.4). Bei beiden Spendern kommt es zu einer Abnahme des prozentualen Anteils an Zellen in der Mitose mit steigender Strahlendosis (Abbildung 4.7, links). Dies wird vor allem bei der hohen Dosis von 4Gy sichtbar. Diese Tendenz konnte sowohl in den PBLs dieser Spender nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen beobachtet werden (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.3 und 7.6), als auch in den PBLs anderen Blutspender nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und Kohlenstoffionen (Daten nicht dargestellt). Der Verlauf der Kurven und das Niveau des Mitoseindex variiert zwischen den Experimenten mit den PBLs verschiedener Blutspender.

Über die Zeit kommt es zunächst in allen Experimenten zu einem Anstieg des Mitoseindex. Diese Zeitabhängigkeit wird nicht nur in bestrahlten Proben deutlich sondern auch in Kontrollen. Sie kann z.B. auf inhomogene Stimulierung der Zellen als auch auf Unterschiede in der Zellzyklusdauer zurückgeführt werden, die durch die unterschiedlichen Subpopulationen der T-Lymphozyten zu Stande kommen könnten. Ein Abfall der Kurven nach ca. 80 bis 90 Stunden wurde nur bei den beiden hier dargestellten Röntgenexperimenten deutlich (Abbildung 4.7, links). Ein geringer Abfall der Kurven konnte noch in PBLs von Spender 1 nach Bestrahlung mit 400MeV/u Kohlenstoffionen festgestellt werden (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.3). Ein Vergleich des Mitoseindex des Röntgenexperimentes von Spender 1 (Abbildung 4.7, links) mit den Ergebnissen aus der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.3) zeigt hinsichtlich des Niveaus keine großen Unterschiede. PBLs des Spenders 2 zeigen einen deutlich geringeren Mitoseindex nach Bestrahlung mit

400MeV/u Kohlenstoffionen (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.6) im Vergleich zur Röntgenbestrahlung (Abbildung 4.7, rechts).

Der Mitoseindex, der durch den Anteil 1. Mitosen zu Stande kommt, zeigt keine Dosisabhängigkeit. Die Kurven der PBLs nach 0 bis 4Gy Röntgenbestrahlung liegen nahezu auf dem gleichen Niveau (Abbildung 4.7, rechts). Die Unterschiede im Mitoseindex müssen daher durch den Anteil an Metaphasen in der 2. Mitose bzw. ≥ 3 . Mitose zu Stande kommen. Der gleiche Effekt läßt sich nach Kohlenstoffionenbestrahlung beobachten (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.3 und 7.6).

In keinem der Experimente, bis auf das Röntgenexperiment von Spender 2 (Abbildung 4.7, unten rechts), ging der Mitoseindex der 1. Mitosen auf 0 zurück. Dies bedeutet, dass auch noch nach 96h Inkubationszeit Zellen die erste Mitose nach Bestrahlung erreichen.

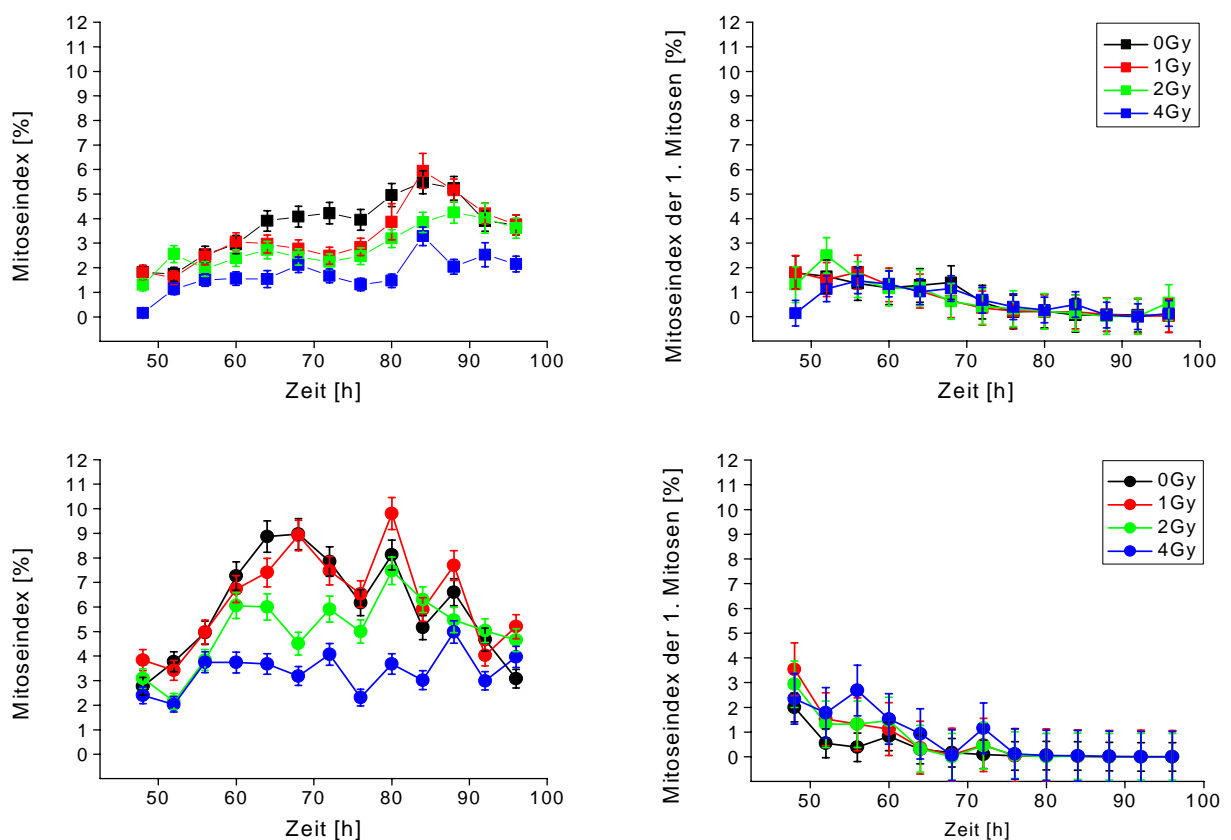


Abbildung 4.7: Mitoseindex (links) und Mitoseindex der 1. Mitosen (rechts) von Spender 1 (oben) und Spender 2 (unten) nach Röntgenbestrahlung. Der Fehler wurde nach Formel 3.2 berechnet und als Fehlerbalken dargestellt.

4.6.2. Intra- und Inter-Donor-Effekte

Sowohl Intra- als auch Inter-Donor-Effekte hinsichtlich des Mitoseindexes wurden in 5 Blutspendern untersucht. Der Mitoseindex von Lymphozytenkultur des Spenders 1 (Abbildung 4.8, links) und Spenders 2 (Abbildung 4.8, rechts) 48h nach Röntgenbestrahlung ist beispielhaft in Abbildung 4.8 über die Dosis aufgetragen. Intra-Donor-Unterschiede zwischen den beiden Spendern werden deutlich, mit Ausnahme der Daten für Spender 2 nach 4Gy Röntgenbestrahlung (Abbildung 4.8, rechts). Ein Vergleich der Röntgendaten von

Spender 1 (Abbildung 4.8, links) und 2 (Abbildung 4.8, rechts) zeigt darüber hinaus Inter-Donor-Unterschiede, wobei die Kurven für Spender 2 auf einem höheren mitotischen Niveau liegen.

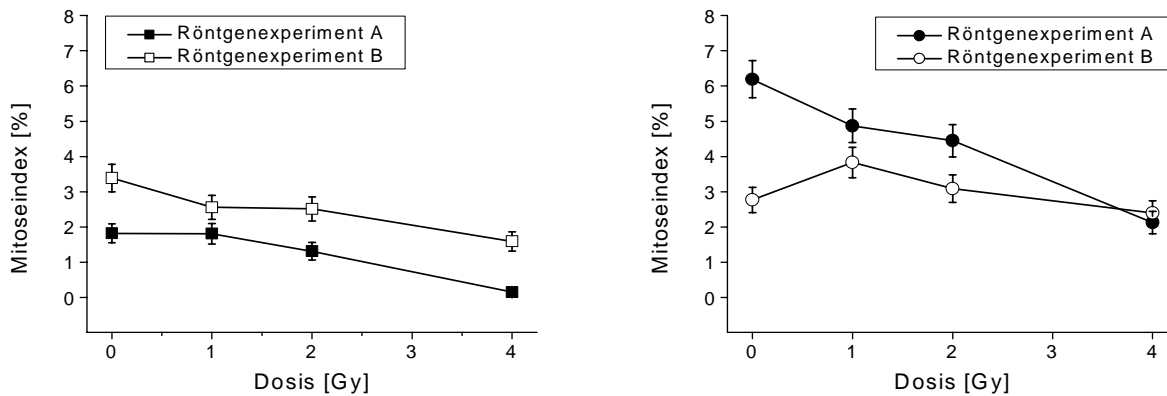


Abbildung 4.8: Vergleich des Mitoseindex der PBLs von Spender 1 (links) und Spender 2 (rechts) 48h nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. Ausführliche Daten der Röntgenexperimente von Spender 1 (Tabelle 7.1 und 7.2) und 2 (Tabelle 7.4 und 7.5) finden sich in Kapitel 7.3.. Der Fehler wurde nach Formel 3.2 berechnet und als Fehlerbalken dargestellt.

Da der Mitoseindex für Kontrollen und bestrahlte Proben sehr ähnlichen Schwankungen unterliegt, sind in Abbildung 4.9 nur die Daten von Kontrollen 48h nach Stimulierung der Zellen dargestellt. Für die Messungen wurden Proben von 5 Spendern über einen Zeitraum von ca. 3 Jahren untersucht.

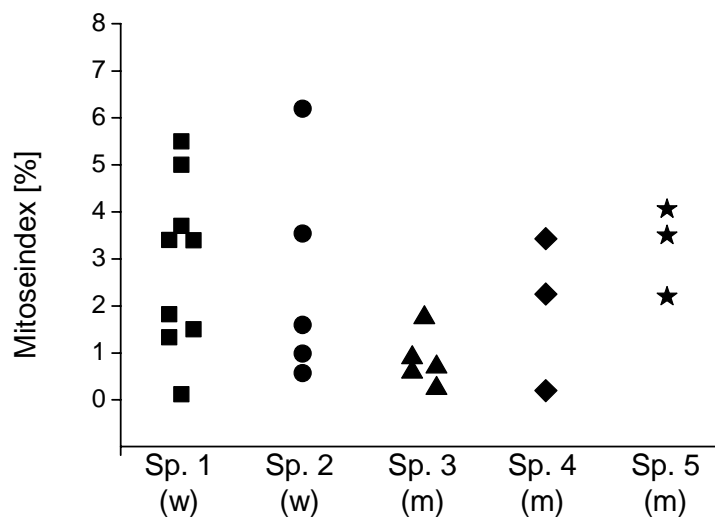


Abbildung 4.9: Mitoseindex in Kontrollen von PBLs verschiedenen Blutspender 48h nach Inkubation für verschiedene Strahlenarten (Sp. = Spender; w = weiblich; m = männlich).

Spender 1, 2 und 4 zeigen deutlich Intra-Donor-Unterschiede im Gegensatz zu Spender 3 und 5, z.B. betrug der niedrigste Mitoseindex in PBLs von Spender 1 0,12% und der höchste Wert 5,5%, während in Spender 3 Werte zwischen 0,24% und 1,75% gemessen wurden. Darüber hinaus werden Inter-Donor-Unterschiede deutlich, wenn die Mittelwerte \pm Standardabweichung (Kapitel 3.16.; Formel 3.4) der einzelnen Blutspender verglichen werden und die Spender lassen sich in drei Gruppen zusammenfassen. Die Mittelwerte des Mitoseindex von PBLs der Spender 1 ($2,86\% \pm 1,79\%$), 2 ($2,57\% \pm 2,32\%$) und 5 ($3,25\%$)

$\pm 0,95\%$) liegen ähnlich hoch. Hingegen liegt der Mittelwert des Mitoseindex von Spender 4 ($1,96\% \pm 1,63\%$) etwas und der von Spender 3 ($0,84\% \pm 0,56\%$) deutlich tiefer.

4.7. Häufigkeitsverteilung von Zellen in der 1. 2. und 3. Mitose nach Stimulierung

Neben dem Mitoseindex stellt auch die Bestimmung des prozentualen Anteils von Metaphasen in der 1., 2. und ≥ 3 . Mitose nach Bestrahlung einen wichtigen Parameter dar, der Informationen über den Zellzyklus und eventuell strahleninduzierte Zellzyklusverzögerungen liefert. Hierzu wurden ca. 500 Metaphasen pro Probe ausgewertet und die detaillierten Daten sind in den Tabellen in Kapitel 7.3 angegeben.

4.7.1. Strahlenbedingte Veränderungen in PBLs verschiedener Spender nach Bestrahlung

In Abbildung 4.10 ist die zeitliche Verteilung von Metaphasen in der 1., 2. und ≥ 3 . Mitose nach Röntgenbestrahlung für Spender 1 (links) und 2 (rechts) dargestellt. Der prozentuale Anteil der Metaphasen in der 1. Mitose nach Bestrahlung (Abbildung 4.10, oben) fällt bei beiden Spendern über den Kultivierungszeitraum auf nahezu 0% ab. Der prozentuale Anteil der 2. Mitosen zeigt in beiden Spendern zunächst einen deutlichen Anstieg auf 50 bis 80% bei allen gemessenen Dosen und geht dann nach 96h Inkubation auf einen Anteil von 10 bis 30% zurück. Der prozentuale Anteil der 3. Mitosen steigt über den Untersuchungszeitraum stark an und erreicht schließlich ein Plateau von ca. 60 bis 90%. In allen Graphen der Abbildung 4.10 kommt es mit steigender Dosis zu einer geringen Verschiebung der Kurven nach rechts. Dies bedeutet, dass bestrahlte PBLs die 1., 2. bzw. 3. Mitose nach Bestrahlung später erreichen als die entsprechenden Kontrollen.

Die Verteilung von Metaphasen in der 1., 2. und ≥ 3 . Mitose nach 400MeV/u Kohlenstoffionenbestrahlung ähnelt dem Verlauf der Graphen nach Röntgenbestrahlung. Jedoch ist der Verlauf der Kurven und somit sowohl die Abnahme als auch der Anstieg des prozentualen Anteils an Metaphasen in der 1., 2. und ≥ 3 . Mitose nach Bestrahlung mit 400MeV/u Kohlenstoffionen geringer (Abbildung 4.11). Der Anteil an 1. Mitosen beträgt z.B. in Spender 1 (Abbildung 4.11, links oben) nach 96h und einer Dosis von 4Gy immer noch 60%. Die Kurven verlaufen für Zellen in der 2. Mitosen flacher als nach Röntgenbestrahlung und zeigen nicht den deutlichen Rückgang zu späteren Probenzeitpunkten (Abbildung 4.11, Mitte). Auch der Anteil ≥ 3 . Mitosen steigt langsamer an und erreicht nur Werte von 15 bis 60% nach 96h bei Spender 1 (Abbildung 4.11, unten links). Bei Spender 2 war in einigen Präparaten die Differenzierung zu undeutlich um die Verteilung der Metaphasen zu bestimmen, daher fehlen in den Kurven einige Datenpunkte. Die Verschiebung der Kurven nach rechts wird vor allem beim Anteil an Metaphasen in höheren Mitosen (≥ 3 . Mitose) deutlich und ist hier stärker als nach Röntgenbestrahlung (Abbildung 4.10 und Abbildung 4.11, unten).

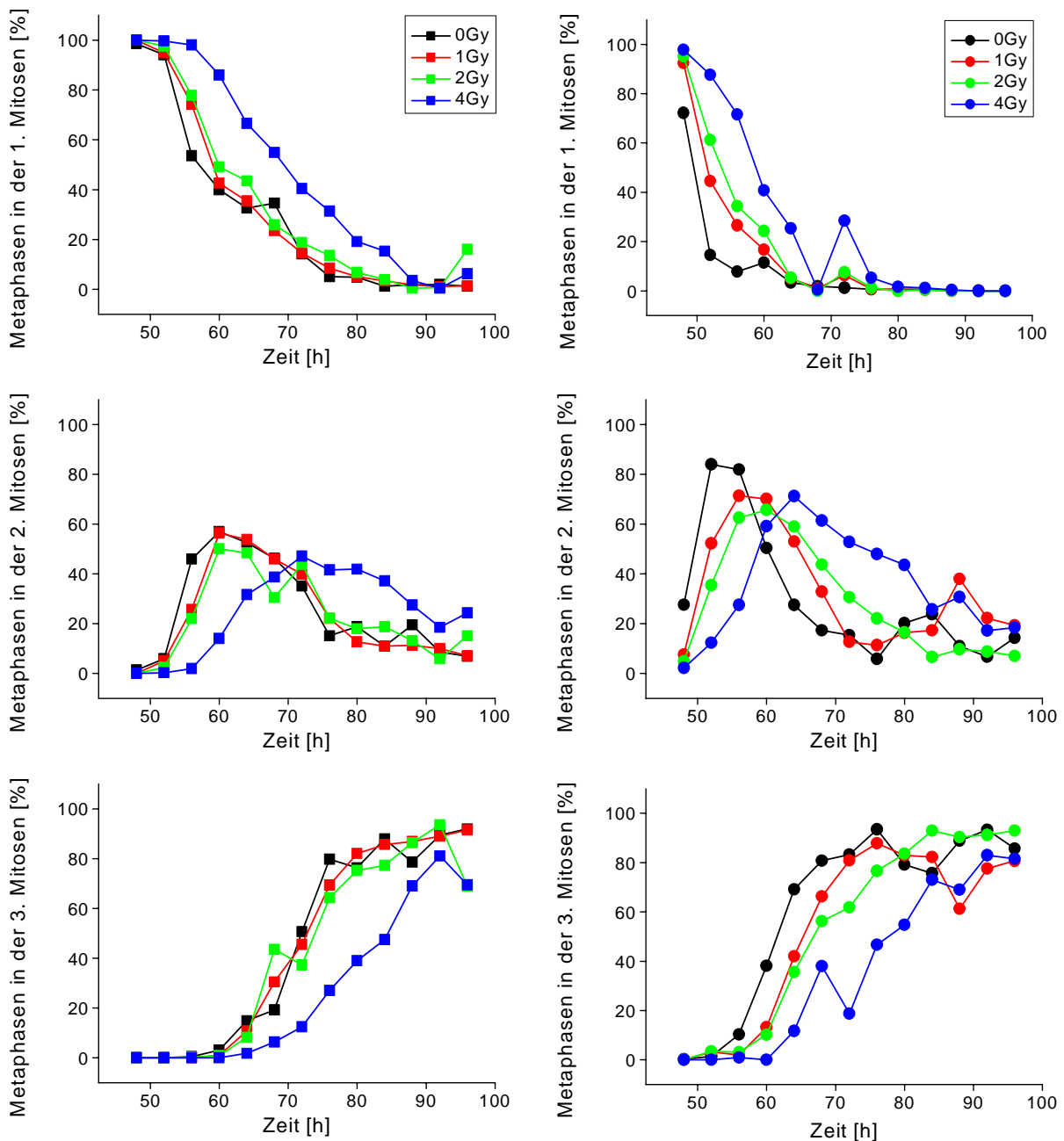


Abbildung 4.10: Verteilung von Zellen in der 1., 2. und ≥ 3 . Mitose (von oben nach unten) nach Röntgenbestrahlung der PBLs von Spender 1 (links, Röntgenexperiment A: Kapitel 7.3.; Tabelle 7.1) und Spender 2 (rechts, Röntgenexperiment B: Kapitel 7.3.; Tabelle 7.4).

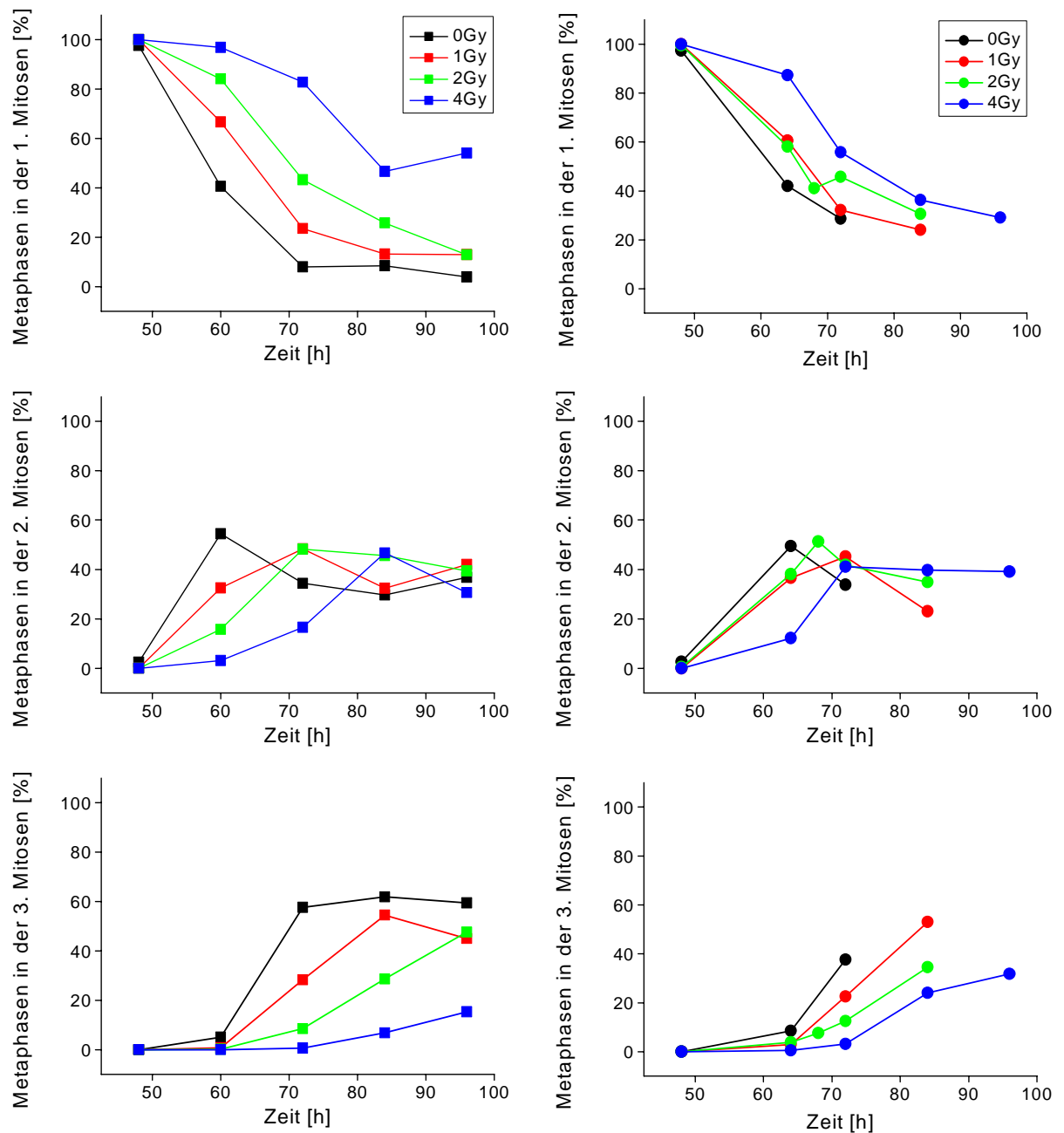


Abbildung 4.11: Verteilung von Zellen in der 1., 2. und ≥ 3 . Mitose nach Bestrahlung der PBLs mit 400MeV/u Kohlenstoffionen mit einem LET von 11keV/ μ m von Spender 1 (links: Kapitel 7.3.; Tabelle 7.3) und Spender 2 (rechts: Kapitel 7.3.; Tabelle 7.6).

4.7.2. Intra-Donor-Effekte

Intra-Donor-Effekte konnten nur 48h nach Röntgenbestrahlung für Spender 1 und 2 untersucht werden, da nur für diese Untersuchungszeit Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten für die beiden Spender vorliegen. Ein Vergleich der Daten für Spender 1 zeigt annähernd identische Werte. In beiden Experimenten liegt der Anteil an Metaphasen in der 1. Mitose zwischen 95 und 100% (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.1 und 7.2). Spender 2 zeigt jedoch deutliche Unterschiede in der Verteilung der Metaphasen nach Röntgenbestrahlung. Die Daten des Röntgenexperimentes A (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.5) liegen im Bereich derer von Spender 1, jedoch zeigen sich deutliche Unterschiede zu den Ergebnissen des Röntgenexperimentes B (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.4). Hier liegt der Anteil an Metaphasen in der 2. Mitose deutlich höher und erreicht in der Kontrolle 27,6% im Vergleich zu 3,3% im Röntgenexperiment A (Kapitel 7.3.; Tabelle 7.5).

4.7.3. Inter-Donor-Effekte

Der prozentuale Anteil der Metaphasen in der 1. Mitose nach Röntgenbestrahlung beträgt bei Spender 1 nach 48h für den untersuchten Dosisbereich nahezu 100% und geht nach 96h Inkubation auf fast 0% zurück, jedoch erreichen auch zu diesem Zeitpunkt noch vereinzelt Metaphasen die 1. Mitose nach Bestrahlung (Abbildung 4.10, oben links). Dies gilt nicht für das Röntgenexperiment A von Spender 2. Hier beträgt der Anteil an 1. Mitosen bereits nach 48h nur noch 72,2% und es befinden sich bereits 27,6% in der 2. Mitose nach Bestrahlung (Abbildung 4.10, oben und Mitte rechts). Auch geht der Anteil an Metaphasen in der 1. Mitose erst zu späteren Zeitpunkten der Probennahme auf 0% zurück. Die Verschiebung der Kurven zu späteren Zeiten ist in Spender 2 (Abbildung 4.10, rechts) deutlicher ausgeprägt als in Spender 1 (Abbildung 4.10, links), wo sie nur für eine Dosis von 4Gy erkennbar ist.

In der Verteilung der Metaphasen nach Bestrahlung mit 400MeV/u Kohlenstoffionen werden keine Unterschiede deutlich (Abbildung 4.11).

4.8. Stimulierung

Untersuchungen zur Stimulierung der Zellen geben wichtige Hinweise inwieweit durch Bestrahlung der Übergang von der G_0 - in die G_1 -Phase beeinflusst wird, da z.B. eine Unterdrückung der Stimulation in geschädigten PBLs eine Unterschätzung des strahlenbiologischen Schadens zur Folge hätte. Von großem Interesse sind in diesem Zusammenhang Intra- und Inter-Donor-Effekten sowie die Dosisabhängigkeit. Der Anteil an stimulierten bzw. proliferierenden PBLs wurde mit spezifischen Antikörpermarkierungen bestimmt. Der Anti-Ki67 Antikörper (Kapitel 3.14.1.) dokumentiert die Expression des Ki67-Antigens und markiert daher Zellen in allen Zellzyklusphasen außer der G_0 -Phase, in welcher noch keine Expression dieses Antigens stattfindet. Da die Konzentration des Antigens Ki67 während des Fortschreitens im Zellzyklus ansteigt, zeigen die markierten Zellen in den Zellzyklusphasen der Interphase eine ansteigende Fluoreszenzintensität mit einem Maximum in der M-Phase (Verheijen et al., 1989a, Verheijen et al., 1989b). Um sicher zu stellen, dass die Antigenkonzentration der Zellen in der G_1 -Phase für eine Markierung mit dem Ki67-Antikörper ausreicht, wurde zusätzlich ein S-Phase-Markierung durchgeführt. Hierzu wurde der Anti-BrdU Antikörper (Kapitel 3.14.2.) verwendet, der den BrdU-Einbau in die DNA dokumentiert und somit Zellen nach Eintritt in die S-Phase nachweist. Sollte der Anteil proliferierender Zellen nach S-Phase-Markierung geringer sein als der Anteil stimulierter

PBLs, so spricht dies für eine Markierung von Zellen in der G_0 -Phase durch den Ki67-Antikörper.

Die Proben wurden zunächst zu mehreren Zeitpunkten nach Stimulierung (0-55h) und Bestrahlung mit Dosen von 0 bis 10Gy ausgewertet. Die Messungen wurden dann jedoch auf einen Zeitpunkt 45h nach Stimulierung beschränkt, da zu späteren Zeitpunkten eine Erhöhung des Anteils an stimulierten Zellen vor allem durch Tochterzellen zu Stande kommt. Zusätzlich zur Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und 400MeV/u Kohlenstoffionen liegen auch Daten für die Markierung mit dem Ki67-Antikörper nach Bestrahlung mit 100MeV/u Kohlenstoffionen vor. Es wurden zwischen 500 und 1000 Zellen mikroskopisch analysiert und der Anteil stimulierter Zellen prozentual zur Gesamtzellzahl aufgetragen. Wird im Folgenden von Abnahme oder Anstieg des prozentualen Anteils an markierten Zellen gesprochen, so beziehen sich diese Prozentzahlen auf den jeweiligen Ausgangswert und es handelt sich nicht um absolute Prozentpunkte. Die Fehler wurden wie in Kapitel 3.16. beschrieben nach Formel 3.2 berechnet.

4.8.1. Strahlenbedingte Veränderungen in PBLs verschiedener Spender nach Bestrahlung

Der in Abbildung 4.12 dargestellte prozentuale Anteil stimulierter PBLs für die unterschiedlichen Strahlenarten gibt einen repräsentativen Überblick des Stimulierungsverhaltens von PBLs verschiedener Spender zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten. Weitere Daten zur Untersuchung der Stimulation mittels Ki67-Test wurden daher in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

In allen Röntgenexperimenten wurde kein Anstieg, wie z.B. bei Spender 5 (Abbildung 4.12, unten links), oder nur ein geringer Anstieg von maximal 30%, wie z.B. Spender 1 (Abbildung 4.12, oben links) des Anteils an stimulierten PBLs über den Inkubationszeitraum von 30 bis 45 bzw. 55h deutlich.

Es zeigte sich in allen Experimenten mit PBLs der verschiedenen Spendern, dass nach Röntgenbestrahlung im untersuchten Dosisbereich von 0 bis 10Gy keine, wie z.B. bei Spender 1 und 5 (Abbildung 4.12, links und Tabelle 4.2) bzw. nur eine Reduktion von 20 bis 45% (Tabelle 4.2) des Anteils an stimulierten PBLs im Vergleich von bestrahlten Proben zur Kontrolle stattfindet. Nur in einem Röntgenexperiment mit PBLs von Spender 2 wurde ein Anstieg von 40% im Dosisbereich von 0 bis 4Gy nach 45h Stimulierung gefunden (Tabelle 4.2).

In den Experimenten mit Kohlenstoffionen wird ein deutlicher Anstieg von 100 bis 500% des prozentualen Anteils an stimulierten PBLs nach Markierung mit dem Ki67-Antikörper im untersuchten Zeitraum sichtbar (Abbildung 4.12, rechts und Tabelle 4.2). Nach Bestrahlung der PBLs von Spender 1 mit 400MeV/u Kohlenstoffionen stieg der Anteil an stimulierten PBLs in allen Dosen von ca. 500% im Zeitraum von 30h bis 45h nach Stimulierung an (Abbildung 4.12, oben rechts). In Spender 2 wurde über den Zeitraum von 36h bis 45h nach Bestrahlung mit 100MeV/u Kohlenstoffionen ein Anstieg des Anteils an stimulierten PBLs von 100% sichtbar, der aber für die einzelnen Dosen variiert (Abbildung 4.12, unten rechts). Da eine Zeitabhängigkeit hinsichtlich der Stimulierung von PBLs nach Kohlenstoffionenbestrahlung nicht nur in bestrahlten Proben, sondern auch in Kontrollen auftritt, läßt sie sich nicht allein auf die Strahlenwirkung zurückführen und wird in der Diskussion näher erörtert.

Im Gegensatz zur Röntgenbestrahlung ist der Anteil an stimulierten PBLs nach Markierung mit dem Ki67-Antikörper nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen um 15 bis 70% niedriger (Abbildung 4.12, rechts und Tabelle 4.2). Nach Bestrahlung der PBLs von Spender 1 mit 400MeV/u bzw. Spender 2 mit 100MeV/u Kohlenstoffionen ist mit zunehmender Dosis bis 4Gy zu beiden Zeitpunkten (30 und 45h bzw. 36 und 45h) der Anteil an stimulierten PBLs um 60% bis 70% bzw. 50% geringer bezogen auf die Kontrollen (Abbildung 4.12, rechts).

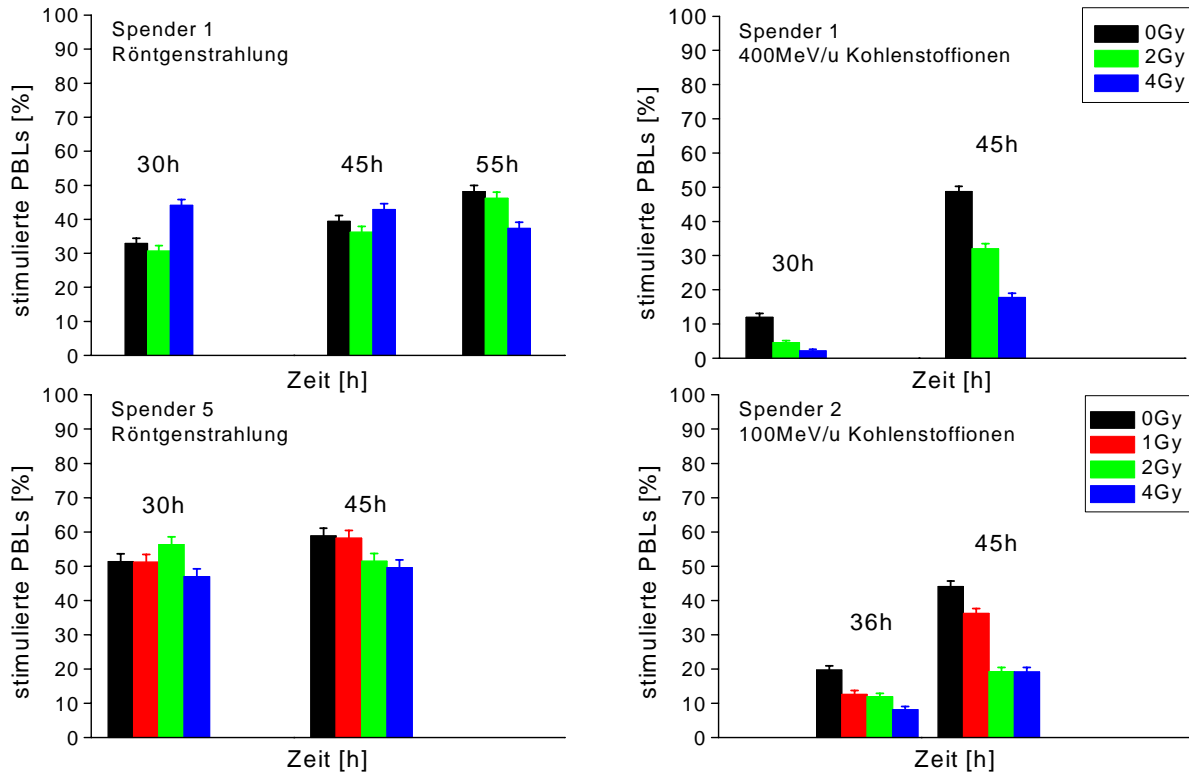


Abbildung 4.12: Prozentualer Anteil an stimulierten PBLs verschiedener Spender nach Antikörpermarkierung (Ki67) zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen (links) und 400MeV/u (oben rechts) bzw. 100MeV/u (unten rechts) Kohlenstoffionen. Der Fehler wurde nach Formel 3.2 berechnet und als Fehlerbalken dargestellt.

Der prozentualen Anteile an stimulierten Zellen (Ki-67-Test) im Vergleich zum prozentualen Anteil an proliferierenden Zellen (BrdU-Test) ist in PBLs von Spender 1 und 2 nach Röntgenbestrahlung bis zu einem Faktor 2 höher. Der etwas geringere Anteil an stimulierten Zellen in den bestrahlten Proben nach Röntgenbestrahlung bezogen auf die jeweiligen Kontrollen wird auch im Anteil proliferierender Zellen sichtbar und liegt bei ca. 20 bis 30% niedriger als in den Kontrollen.

Spender	Strahlenart	Gesamtzahl Experimente	Anzahl Experimente (Veränderung Dosis-Effekt)	Anzahl Experimente (Veränderung Zeit-Effekt)
1	Röntgenstrahlung	6	3 (-) 3 (keine)	1 (keine) 2 (+) 3 (n.u.)
	100MeV/u ^{12}C -Ionen	1	1 (-)	1 (n.u.)
	400MeV/u ^{12}C -Ionen	1	1 (--)	1 (+++)
2	Röntgenstrahlung	3	2 (keine) 1 (+)	1 (+) 2 (n.u.)
	100MeV/u ^{12}C -Ionen	1	1 (-)	1 (+++)
3	Röntgenstrahlung	2	1 (-) 1 (keine)	2 (n.u.)
5	Röntgenstrahlung	3	1 (-) 2 (keine)	1 (keine) 2 (n.u.)

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der Experimente von vier verschiedenen Spendern bei denen der prozentuale Anteil an stimulierten PBLs (Ki67-Test) nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und 100 bzw. 400MeV/u Kohlenstoffionen (^{12}C -Ionen) bestimmt wurde. Der Umfang der Veränderung bezogen auf die Kontrolle (Dosis-Effekt) bzw. auf ein zeitlich vorangegangenes Messergebnis der entsprechenden Dosis (Zeit-Effekt) wurde wie folgt beurteilt: ---/+++ = Abnahme bzw. Anstieg über 100%; --/++ = Abnahme bzw. Anstieg zwischen 50 und 100%; -/+ = Abnahme bzw. Anstieg bis 50% und keine = keine Abnahme bzw. Anstieg. Da bei einigen Experimenten nur ein Zeitpunkt untersucht wurde, konnte keine Aussage hinsichtlich eines Zeit-Effekts gemacht werden (n.u. = nicht untersucht).

4.8.2. Intra-Donor-Effekte

In Abbildung 4.13 sind die Anteile an stimulierten PBLs nach Antikörpermarkierung mit Anti-Ki67 für vier verschiedene Spender nach 45h Stimulierung und Bestrahlung mit Dosen von 0, 2 und 4Gy Röntgenstrahlen dargestellt.

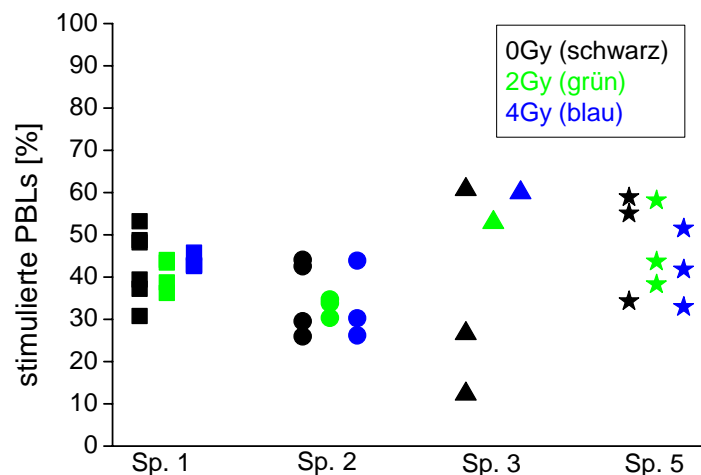


Abbildung 4.13: Vergleich der prozentualen Anteile an stimulierten PBLs (Ki67) verschiedener Spender 45h nach Röntgenbestrahlung (Sp. = Spender).

Die Daten der Spender 1, 2 und 3 schwanken für die drei Dosen über einen Bereich von 30 Prozentpunkten, während die Kontrollen von Spender 3 eine deutlichere Schwankung über einen Bereich von 50 Prozentpunkten zeigen. Es wird also in allen untersuchten Spendern ein Inter-Donor-Effekt deutlich. Da für die einzelnen Spender nach Kohlenstoffionenbestrahlung nicht mehrere unabhängige Datensätze vorliegen, kann hier keine Aussage bezüglich Intra-Donor-Unterschiede gemacht werden.

4.8.3. Inter-Donor-Effekte

Die in Abbildung 4.13 dargestellten prozentualen Anteile an stimulierten PBLs 45h nach Röntgenbestrahlung zeigen große Schwankungen innerhalb der einzelnen Spender, die im Bereich von 20 bis 60 Prozentpunkten liegen. Nur eine der Kontrollen von Spender 3 liegt mit nur 10% stimulierter PBLs tiefer als alle anderen Datenpunkte. Aufgrund der großen Schwankungsbreite des Anteils stimulierter PBLs in den verschiedenen Spendern kann nicht von einem Inter-Donor-Effekte gesprochen werden. Die Anzahl an Experimenten mit Kohlenstoffionen ist nicht ausreichend um Aussagen bezüglich Inter-Donor-Unterschiede zu machen (Tabelle 4.2).

4.9. Apoptose

Ein weiterer Faktor, der die Auswertung von Metaphasepräparaten zusätzlich zur Proliferation und Stimulation beeinflussen kann, ist die Apoptose. Zur Abschätzung der Apoptose in PBLs wurden der ApoNexin-Test (Kapitel 3.15.1.) und der CDD⁺-ELISA (Kapitel 3.15.2.) verwendet. Mit Hilfe des ApoNexin-Tests wird der prozentuale Anteil an markierten bzw. geschädigten PBLs bestimmt. Hierbei wurden die Daten für apoptotische und nekrotische PBLs zusammengefasst, da im Anteil der nekrotischen Zellen auch der Anteil an sekundär- bzw. spätapoptotischen PBLs enthalten ist. Es wurden 250 bis 500 PBLs pro Probe bis 93h nach Bestrahlung mit Dosen von 0 bis 20Gy fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Beim CDD⁺-ELISA werden für die gemessenen Proben OD-Werte erhalten. Es konnte auch hier die Apoptose und die Nekrose bestimmt werden, wobei nur die Daten der Apoptose dargestellt sind, da die OD-Werte für die Nekrose in Kontrollen und bestrahlten Proben identisch waren und keine Erhöhung der OD im Vergleich zum Hintergrund vorlag. Die PBLs wurden 48h nach Röntgenbestrahlung mit Dosen von 0 bis 10Gy ausgewertet.

4.9.1. Strahlenbedingte Veränderungen in PBLs verschiedener Spender nach Bestrahlung

In Abbildung 4.14 wurden einige repräsentativen Experimente, bei denen der prozentuale Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen mit dem ApoNexin-Test gemessen wurden, graphisch als Säulendiagramm dargestellt. Drei weitere Röntgenbestrahlungen der PBLs von Spender 1 und 3 zeigten entsprechende Ergebnisse wie die der hier abgebildeten Röntgenexperimente und wurden daher nicht aufgeführt. Der prozentuale Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen zeigt nach Röntgenbestrahlung der PBLs von Spender 1 ein Maximum bei ca. 48h. Ein ähnliches zeitliches Verhalten der Apoptose wird in PBLs von Spender 4 nach Bestrahlung mit 400MeV/u Kohlenstoffionen sichtbar, jedoch ist das Niveau des Anteils an geschädigten Zellen deutlich höher (Abbildung 4.14, unten rechts). Nach Bestrahlung der PBLs von Spender 1 mit 100MeV/u Kohlenstoffionen (Abbildung 4.14, oben links) wird erst nach 57h ein Maximum erreicht aber auch hier kommt es danach zu einem Rückgang des Anteils geschädigter Zellen, wohingegen nach Bestrahlung von PBLs

des Spenders 1 mit 400MeV/u Kohlenstoffionen der prozentuale Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen nach ca. 57h ein Plateau erreicht (Abbildung 4.14, unten links). Drei weitere Röntgenexperimente mit PBLs von Spender 1 und 3 zeigten für die gemessenen Probenzeitpunkte nach 24 bzw. 48h annähernd identische Ergebnisse wie in Abbildung 4.14 oben rechts.

In allen Experimenten ist zu einem Großteil der Probenzeitpunkte eine Dosisabhängigkeit erkennbar. Der Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen ist in den bestrahlten Proben stets höher als in den unbestrahlten und häufig ist auch ein Anstieg des Anteils mit zunehmender Dosis erkennbar. Nur in Proben, die unmittelbar nach der Bestrahlung aufgearbeitete wurden, zeigten die Kontrollen das gleiche bzw. zum Teil sogar ein höheres Niveau an apoptotischen und nekrotischen Zellen als die bestrahlten Proben (Abbildung 4.14, links). Dies kann jedoch auf die Handhabung der Zellen während der Aufreinigung des Blutes zurückgeführt werden, die eine mechanische Belastung für die Zellen darstellt. Die Kontrollen zeigen über den Inkubationszeitraum häufig eine starke Schwankung von 10 bis 40% apoptotischer und nekrotischer Zellen (Abbildung 4.14, links).

Ein deutlich höheres Niveau der Apoptose zeigt sich nach Bestrahlung der PBLs verschiedener Blutspender mit Kohlenstoffionen im Vergleich zur Röntgenbestrahlung. Dies konnte in allen durchgeführten Experimenten beobachtet werden.

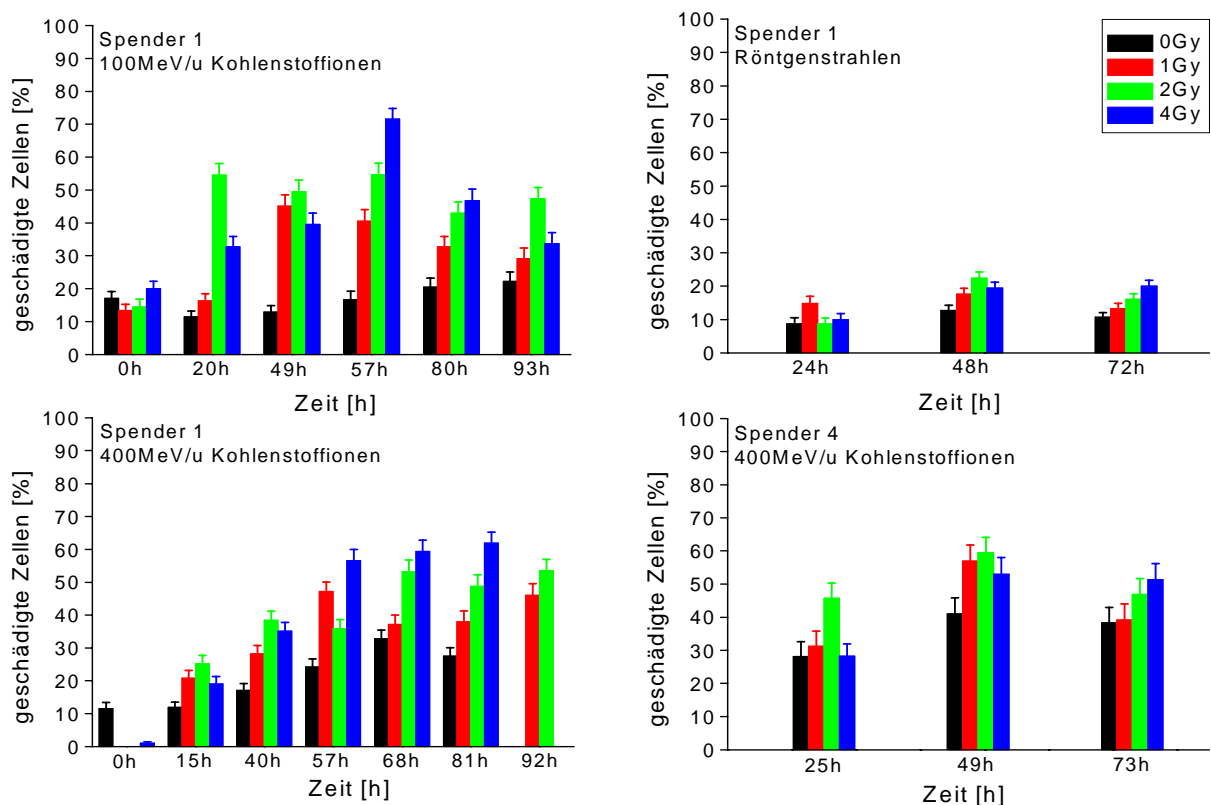


Abbildung 4.14: Anteil geschädigter, d.h. apoptotischer und nekrotischer, PBLs (ApoNexin-Test) zu verschiedenen Untersuchungszeiten von Spender 1 nach Bestrahlung mit 100MeV/u (oben links) und 400MeV/u Kohlenstoffionen (unten links) bzw. nach Röntgenbestrahlung (oben rechts) und von Spender 4 nach 400MeV/u Kohlenstoffionen (unten rechts). Die Skalierung der X-Achse ist unterschiedlich in den einzelnen Diagrammen. Der Fehler wurde nach Formel 3.2 berechnet und als Fehlerbalken dargestellt.

Um den dosisabhängigen Anstieg der Apoptose aus der Annexin-Markierung zu überprüfen wurde eine weitere Methode zur Messung der Apoptose, der CDD⁺-Elisa, durchgeführt. Hierzu wurden Zellen von Spender 1 und 2 mit Röntgenstrahlen bestrahlt und 48h später untersucht. In Abbildung 4.15 sind die normierten OD-Werte der Apoptosemessung für PBLs von Spender 2 48h nach Röntgenbestrahlung dargestellt. Die OD-Werte der bestrahlten Proben sind auf die der Kontrollen normiert (Kapitel 3.15.2.; Formel 3.1), d.h. nach einer Dosis von 4Gy hat sich die OD im Vergleich zur Kontrolle verdoppelt (2,0). Auch in Proben von Spender 1 wird ein Anstieg der OD nach Röntgenbestrahlung im Vergleich zur OD in den Kontrollen deutlich (Daten nicht dargestellt).

Somit konnte der Anstieg der Apoptose mit steigender Dosis nach Röntgenbestrahlung (Abbildung 4.14, oben rechts), der nach Messung der Apoptose mit dem ApoNexin-Test sichtbar wird, bestätigt werden. Da die Proben der Nekrose nach Messung mit dem ELISA nur eine gering höhere OD als die Messung des Hintergrundes (ABTS-Lösung) aufweisen, ist anzunehmen, dass es sich bei den Annexin und Propidiumjodid positiven Zellen in der Messung mit dem ApoNexin-Test vorwiegend um spätapoptotische Zellen handelt und nicht um Nekrosen.

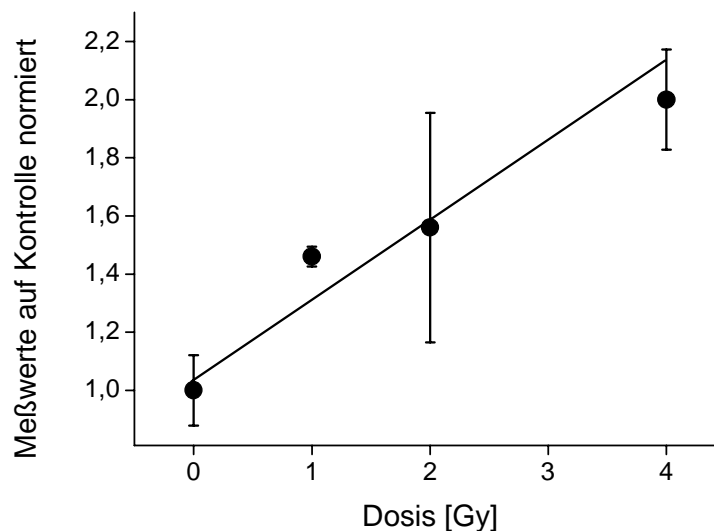


Abbildung 4.15: Apoptosemessung mit dem CDD⁺-Elisa 48h nach Röntgenbestrahlung der PBLs von Spender 2. Die OD-Werte der bestrahlten Proben wurden auf die OD-Werte der Kontrollen normiert (Kapitel 3.16.; Formel 3.1). Beim Fehler handelt es sich um die Standardabweichung (Kapitel 3.16.; Formel 3.4) aus der Doppelbestimmung der Proben, die auf die normierten Datenpunkte übertragen wurde.

4.9.2. Intra- und Inter-Donor-Effekte

Um Aussagen über eventuell vorhandene Intra-Donor-Effekte hinsichtlich strahleninduzierten Apoptose machen zu können fehlt es an ausreichend Daten für die einzelnen Spender. Es sind zwar Unterschiede zu erkennen, diese liegen jedoch im Fehlerbereich der Messmethode.

Auch zwischen den einzelnen Blutspendern können keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Die Daten für den Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen unterliegen zwar Schwankungen, jedoch ist die Datenmenge nicht ausreichend um eine Erhöhung des Anteils an apoptotischen und nekrotischen Zellen in einem oder mehreren Blutspendern zu beschreiben.

5. Diskussion

5.1. Ziel und Grundlagen der Untersuchung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, strahleninduzierte Chromosomenveränderungen in peripheren Blutlymphozyten weniger gesunder Blutspender nach Bestrahlung mit dünnionisierenden Röntgenstrahlen und dichtionisierenden Kohlenstoffionen zu untersuchen. Hierbei standen insbesondere vorhandene Unterschiede hinsichtlich der Strahlensensibilität zwischen verschiedenen Spendern sowie deren zeitliche Schwankung innerhalb eines Spenders im Mittelpunkt. In diesem Zusammenhang konnten Unterschiede in Blutspendern hinsichtlich der Anzahl strahleninduzierter DNA-Schäden sowohl in Interphase- als auch Metaphase-Zellen nachgewiesen werden. Individuelle Schwankungen wurden auch bei weiteren biologischen Faktoren sichtbar, die die Aberrationsrate beeinflussen können wie z.B. die Zellproliferation, die Stimulierung von PBLs und die Induktion der Apoptose. Die erhaltenen Ergebnisse der Messung der Anzahl von Chromosomenschäden in Metaphasen geben weitere Hinweise über die Möglichkeiten und die Grenzen einer biologischen Dosimetrie sowie der Entwicklung eines prädiktiven Tests.

5.1.1. Verwendung von PBLs in der biologischen Dosimetrie

Periphere Blutlymphozyten sind neben humanen Hautfibroblasten das am häufigsten verwendete Zellsystem, wenn die Wirkung von Strahlung auf den Menschen untersucht werden soll. Lymphozyten sind wie auch die Fibroblasten bei einer Strahlenexposition stets involviert und werden daher zur Abschätzung von strahleninduzierten DNA-Schäden verwendet. Im Gegensatz zu humanen Hautfibroblasten ist die Entnahme von PBLs deutlich einfacher, da sie aus Vollblut isoliert werden können. Ein weiterer Vorteil für Bestrahlungsexperimente ist, dass sich in vivo die PBLs fast ausschließlich in der G₀-Phase befinden, bis auf die Zellen, die durch spezifische Antigene stimuliert wurden. Von Nachteil könnte jedoch die Tatsache sein, dass Lymphozyten aus Subpopulationen bestehen, die sich in ihren biologischen Eigenschaften, wie z.B. der Strahlensensibilität unterscheiden (Schwartz und Gaulden, 1980; Stewart et al., 1988; Menz et al., 1997; Kern et al., 1999).

Seit den sechziger Jahren wird die Dosis von strahlenexponierten Personen durch Untersuchung biologischer Veränderungen in peripheren Blutlymphozyten begleitend zu physikalischen Messungen abgeschätzt (Kapitel 2.1.), die sogenannte biologische Dosimetrie (Überblick in Müller und Streffer, 1991; Wolff, 1991). Die Bestimmung der Anzahl an Aberration in PBLs gehört hierbei zu der am häufigsten verwendeten Methode (Gooch et al., 1964; Bender und Gooch, 1967). Mit Hilfe von Eichkurven, die durch in vitro Experimente gewonnen wurden, wird ein Zusammenhang zwischen der Anzahl an Chromosomenschäden pro Zelle und der erhaltenen Strahlendosis hergestellt (Lloyd et al., 1975; Edwards et al., 1979; Pantelias und Maillie, 1984; Fabry et al., 1985; Pantelias und Maillie, 1985; Bauchinger, 1995; Finnon et al., 1995; Edwards, 1997; Bauchinger und Schmid, 1998; Durante et al., 1998; Lindholm et al., 1998; Barquinero et al., 1999; Prasanna et al., 2000; Stronati et al., 2001). Bisher wird in jedem Labor nur eine Eichkurve angefertigt, da gerade in den niedrigen Dosisbereichen aus statistischen Gründen mehrere hundert Zellen ausgewertet werden müssen und somit die Herstellung dieser Kurven sehr arbeitsaufwendig ist.

5.1.2. Einfluß von BrdU auf zellbiologische Parameter

Wie bereits in Kapitel 2.1. beschrieben nimmt mit jeder Zellteilung die Anzahl an Aberrationen ab (Sasaki und Norman, 1967; Bedford et al., 1978; Scott und Lyons, 1979; Bauchinger et al., 1986). Um eine Verdünnung der Aberrationsrate durch Zellen in der 2. oder einer höheren Mitose nach Bestrahlung zu verhindern, die eine Unterschätzung des strahlenbiologischen Schadens zur Folge hätte, werden ausschließlich Metaphasen der 1. Mitose nach Bestrahlung ausgewertet. Die Fluoreszenz plus Giemsa-Färbung (FPG) ermöglicht eine Unterscheidung der Mitosen in den einzelnen Replikationsrunden (Abbildung 3.2), basierend auf einem BrdU-Einbau und einer anschließenden differenziellen Färbung wie bereits in Kapitel 3.12. genauer beschrieben wurde (Perry und Wolff, 1974).

Da zur Durchführung der differenziellen Färbung dem Zellkulturmedium BrdU zugegeben werden muss, wurde dessen Wirkung auf die Zellen gemessen (Kapitel 4.1.). In den untersuchten Parameter, d.h. der Anzahl an Chromosomenschäden in Metaphasezellen, der Zellzahl, der Induktion von Apoptose und der Stimulationsrate, konnte kein Einfluß in der verwendeten Konzentration von 6µg BrdU pro ml Medium (20µmol/l) auf die PBLs nachgewiesen werden. Dagegen wurde eine geringe Reduktion des Mitoseindex in Proben mit BrdU im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen gefunden. Untersuchungen von Scott und Lyons (1979) sowie Berger (2001) zeigten keinen Einfluss von BrdU auf die Aberrationsrate in PBLs bzw. Hautfibroblasten bis zu einer Konzentration von 10µg pro ml Medium. Kolin-Gerresheim und Bauchinger (1981) konnten bei Messungen der Wirkung von BrdU auf die Zellproliferation in PBLs von 7 Spendern bis zu einer Konzentration von 3µg/ml (10µmol/l) keinen Effekt erkennen. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendete Konzentration von 6µg/ml wurde nur zu frühen Probenzeitpunkten (bis ca. 52h) ein geringer inhibitorischer Effekt auf die Zellproliferation nachgewiesen, der jedoch zu späteren Inkubationszeitpunkten verschwand. Daraus folgerten Kolin-Gerresheim und Bauchinger (1981), dass die Zellen mit zunehmender Kultivierungszeit den zunächst inhibitorischen Einfluß von BrdU überwinden. Bei höheren Konzentrationen bis 118µg BrdU pro ml Medium wurde eine starke Hemmung der Zellproliferation sichtbar.

Abschließend läßt sich sagen, dass der Einfluß von BrdU in der hier verwendeten Konzentration für die Bestimmung von DNA-Schäden in Metaphasepräparaten von PBLs vernachlässigt werden kann, da BrdU keine Veränderung der Aberrationsrate, der Zellzahl, der Induktion von Apoptose sowie dem Umfang an stimulierten Zellen bewirkte und der Effekt auf den Mitoseindex gering war. In anderen Zelltypen wie z.B. primären Fibroblasten wurde ein Einfluss von BrdU in Abhängigkeit von der Konzentration nachgewiesen (Morris, 1991; Berger, 2001). Durch die Untersuchung unstimulierter bzw. ruhender Interphasezellen kann diese Problematik umgangen werden, da hier der Einsatz von BrdU nicht nötig ist.

5.2. Chromosomenschäden in Interphasezellen

Die PCC-Technik ermöglicht die Untersuchung von Chromosomenschäden in Interphasezellen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode in Anlehnung an Pantelias und Maillie (1983) durchgeführt (Kapitel 3.8.) und eine frühzeitige Kondensation des Chromatins in Interphasezellen durch Fusion mit mitotischen CHO-K1-Zellen induziert. Hierzu wurden unstimulierte PBLs in der G₀-Phase direkt nach der Bestrahlung fusioniert um den primär erzeugten Schaden (Initialschaden, ID) zu messen sowie 20h nach Bestrahlung um den Restschaden nach Reparatur (R) zu bestimmen (Kapitel 4.5.).

Die Anzahl zusätzlicher Fragmente pro Zelle stellt die Differenz der Anzahl an Fragmenten der bestrahlten Probe zur entsprechenden Kontrolle dar und wurde für PBLs der Spender 1 und 2 in Abbildung 4.6 nach Röntgenbestrahlung aufgetragen. Die Anzahl zusätzlicher Fragmente unmittelbar nach Röntgenbestrahlung beträgt 8,8 zusätzliche Fragmente pro Gy für Spender 1 und 5,4 zusätzliche Fragmente pro Gy für Spender 2. Daten zum Initialschaden in PBLs von Spender 2 liegen im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Werte. Diese schwanken zwischen 3 (Pantelias und Maillie, 1984) und 6 (Pantelias und Maillie, 1985; Greinert et al., 1995) zusätzlichen Fragmenten pro Gy Röntgenstrahlung. Daten für Spender 1 liegen mit 8,8 zusätzlichen Fragmenten darüber. Eine Auswertung der PCC-Präparate zur Reparatur der PBLs von Spender 1 zeigte eine deutliche Reduktion der Anzahl an zusätzlichen Fragmenten von 8,8 (ID) auf 2,1 (R). Eine Abschätzung des Restschadens in PBLs von Spender 2 war nicht möglich, da sehr wahrscheinlich durch Verlust der Mitosen während der Zentrifugation die Fusionsrate in den Präparaten der Reparatur nahezu null war. Die Reduktion der Anzahl zusätzlicher Fragmente 20h nach Röntgenbestrahlung im Vergleich zum Initialschaden um ca. 75% in PBLs von Spender 1 zeigt, dass die Zellen in der Lage sind, die strahleninduzierten Doppelstrangbrüche zum Teil zu reparieren. Jedoch ist es nicht möglich abzuschätzen inwiefern diese Reparatur korrekt ist, da die Zellen die Bruchstücke willkürlich verknüpfen.

Der Anstieg der Chromosomen- bzw. Fragmentenanzahl in den bestrahlten G₀-PBLs kommt durch strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) zu Stande, jedoch konnte eine 1:1 Korrelation, d.h. ein Doppelstrangbruch führt zu einem weiteren zusätzlichen Fragmenten, in Strahlenexperimenten nicht bestätigt werden. Die Anzahl von DSBs in Säugerzellen liegt mit 36 ± 5 pro Gy Röntgenstrahlung (Überblick in Heilmann et al., 1995) stets über der Anzahl an zusätzlichen Fragmenten in den entsprechenden PCC-Präparaten. Zum Beispiel ergibt sich für Spender 1 eine Korrelation von 4:1 und für Spender 2 eine von 7:1, d.h. 4 bzw. 7 DNA-Doppelstrangbrüche führen zu einem zusätzlichen Fragment. Gründe für die abweichende Korrelation könnten darin bestehen, dass das Auflösungsvermögen des Mikroskops nicht ausreicht, um kleine Bruchstücke zu detektieren oder dass einige DSBs während der einstündigen Fusion der Zellen repariert werden (Okayasu und Iliakis, 1993), sowie in der unterschiedlichen MPF („mitosis-promoting factor“-)Aktivität der verwendeten mitotischen Zellen (Cheng et al., 1993).

5.3. Chromosomenschäden in Metaphasen peripherer Blutlymphozyten

Um Intra- und Inter-Donor-Effekte hinsichtlich der Erzeugung strahleninduzierter Chromosomenschäden untersuchen zu können, wurde in PBLs von verschiedenen Spendern (Kapitel 7.3.; Tabellen 7.1a bis 7.10) nach in vitro Bestrahlung der DNA-Schaden in Metaphase-Zellen der 1. und 2. Mitose zu verschiedenen Zeiten gemessen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Metaphasepräparate ausschließlich mit der Fluoreszenz plus Giemsa-Methode gefärbt und alle mit dieser Technik detektierbaren, d.h. instabilen Aberrationen wie z.B. polyzentrische Chromosomen, zentrische Ringe und azentrische Aberrationsarten ausgewertet. Auf Fluoreszenz in situ Hybridisierung, die auch den Nachweis von stabilen Aberrationen, wie z.B. Translokationen oder Insertionen ermöglicht, wurde jedoch wegen der hohen Probenzahl und dem damit verbundenen hohen Kostenaufwand verzichtet.

Da in den einzelnen Arbeitsgruppen unterschiedliche Aberrationstypen ausgewertet werden, wie z.B. Tabelle 5.1 entnommen werden kann, musste der Vergleich häufig auf dizentrische Chromosomen beschränkt werden. Dizentrische Chromosomen werden stets bei der Untersuchung von giemsaefärbten Metaphasepräparaten ausgewertet und häufig auch in FISH-gefärbten Präparaten bestimmt, da sie eine geringe Spontanrate in Kontrollen aufweisen (z.B. Bauchinger, 1995; Edwards, 1997). Darüber hinaus vertreten einige Autoren die Ansicht, dass dizentrische Chromosomen gut erkennbar sind und die Auswertung daher einem geringeren subjektiven Fehler unterliegt (Lloyd und Purrott, 1981; Edwards, 1997). Jedoch zeigten Untersuchungen der gleichen Probe in verschiedenen Laboren deutliche Schwankungen in der Anzahl an dizentrischen Chromosomen bis zu einem Faktor von 3 (Bianchi et al., 1982; Lloyd et al., 1988; Lloyd et al., 1992). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass jedes Labor seine eigenen Eichkurven anfertigen muss um die Genauigkeit der Dosisabschätzung zu verbessern. Einige Arbeitsgruppen schließen in die Auswertung zentrische Ringe und zusätzlich entstandene azentrische Aberrationen mit ein (z.B. Fabry et al., 1985; Lloyd et al., 1988; Barquinero et al., 1997). Dies ist vor allem notwendig, wenn die durch unterschiedliche Strahlenarten erzeugten Chromosomenschäden verglichen werden sollen, wie z.B. bei der Bestimmung der RBW (Kapitel 5.3.5.), da sich das Aberrationsspektrum mit dem LET ändert (Gerasimenko et al., 1980; Ritter et al., 1996; Ohara et al., 1998; Anderson et al., 2000).

5.3.1. Spontanrate von Aberrationen in Kontrollen

Die Spontanrate von Chromosomenschäden in Körperzellen wie z.B. PBLs gibt einen Hinweis auf die Lebensgewohnheiten oder die Umweltbedingungen der untersuchten Person (z.B. Andersson, 1993).

In den durchgeführten Experimenten mit PBLs der Spender 1 und 2 betrug die Anzahl aller Chromosomenaberrationen in unbestrahlten Metaphasen der 1. Mitose nach Stimulierung 2 bis 3,7 pro 100 Zellen. In der Literatur werden zur Bestimmung der Spontanrate häufig Ergebnisse aus Experimente mit PBLs verschiedener Spender zusammengefasst (z.B. Schmid et al., 1984). Wird dies für Spender 1 und 2 durchgeführt, so wird ein Wert von 3,1 erhalten (Tabelle 5.1). Für dizentrischen Chromosomen liegt die Spontanrate in den sechs durchgeführten Experimenten mit PBLs der beiden Spender zwischen 0 und 0,75 und der errechnete Mittelwert beträgt 0,36 (Tabelle 5.1).

Wie vorne erwähnt, werten die verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Aberrationstypen aus. Tabelle 5.1 gibt einen Überblick über die gemessenen Chromosomenschäden und die dabei ermittelten Spontanraten. Die für die Anzahl aller Aberrationstypen gemessenen Werte in 100 Zellen liegen zwischen 0,033 (Fabry et al., 1985) und 3,5 (Gerasimenko et al., 1980). Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Spontanrate von 3,1 Aberrationen pro 100 Zellen in PBLs der Spender 1 und 2 bewegen sich in diesem Bereich, wobei die meisten Literaturwerte deutlich geringere Werte aufweisen. Werden für einen Vergleich der Spontanraten nur dizentrische Chromosomen zugrunde gelegt, werden sehr geringe Spontanraten von unter 0,1 dizentrischen Chromosomen in 100 untersuchten Metaphasen beschrieben (Schmid et al., 1984; Fabry et al., 1985; Andersson, 1993; Lindholm et al., 1998). Nur Gerasimenko et al. (1980) findet in einem der Experimente eine identisch hohe Spontanrate an dizentrischen Chromosomen von 0,36.

Diese Unterschiede lassen sich nicht ohne weiteres erklären. Zwar zählen einige Arbeitsgruppen nur dizentrische Chromosomen, die von einem azentrischen Fragment begleitet werden und andere Arbeitsgruppen auch dizentrische Chromosomen ohne Fragment (Tabelle 5.1), jedoch ist der Anteil an dizentrischen Chromosomen ohne begleitendes

Fragment in den Kontrollen der vorliegenden Arbeit 0% und auch in Untersuchungen von Lloyd et al. (1992) betrug er nur ca. 20%. Es könnten unterschiedliche Kulturbedingungen oder individuelle Unterschiede der Blutspender Einfluß auf die Spontanrate haben (Überblick Lloyd et al., 1975). Des Weiteren könnten die Unterschiede durch die Person, die die Chromosomenpräparate auswertet, zu Stande kommen (Bianchi et al., 1982; Lloyd et al., 1988; Lloyd et al., 1992). Eine Vorbelastung der Blutspender, die eine Erhöhung der Spontanrate erklären würde, ist nicht bekannt.

Färbung	ausgewertete Aberrationstypen	Spontanrate [dic/100 Zellen]	Spontanrate [Summe aller Aberrationen /100 Zellen]	Autoren
Giemsa	dic, r, ace, cte	0,15 (max. 0,36)	3,47	Gerasimenko et al., 1980
Giemsa	dic, ace	0,038	0,33	Schmid et al., 1984
FPG	dic, r, ace	0,033	0,033	Fabry et al., 1985
Giemsa	dic, r, ace	0,2	0,2	Tawn et al., 1985
FPG	dic, ace	0	0,17	Kakati et al., 1986
FPG	dic+, r, ace	0,2	0,49	Lloyd et al., 1988
Giemsa	dic, r, csb, ctb, t	0	0,1	Poncelet et al. 1988
FPG	dic+, r, ace	0,16	0,61	Lloyd et al., 1992
Giemsa	dic, r, ace, ctb, cte,	0,014 ± 0,12	0,74 ± 0,96	Andersson, 1993
FISH	dic, r, ace, t, inv, ins	0,15	0,35	Finnon et al., 1995
FPG	dic+, r, ace	0,091	0,67	Barquinero et al., 1997
FPG	dic+	0,1	n.b.	Edwards, 1997
FPG	dic+, r, ace	0,053	0,21	Lindholm et al., 1998
FPG	dic, r, ace, ctb, cte	0,36	3,1	vorliegende Arbeit, 2002

Tabelle 5.1: Die in der Literatur sowie der vorliegenden Arbeit ermittelten Spontanraten von diversen Chromosomenschäden in Metaphasen von PBLs nach Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) oder Giemsa- bzw. Fluoreszenz plus Giemsa-Färbung (FPG). (ace: Summe aller azentrischen Fragmente, d.h. Chromosomentypbrüche; csb: Chromosomenbrüche; ctb: Chromatidbrüche; cte: Chromatidaustauschaberrationen; dic: dizentrische Chromosomen mit und ohne azentrischem Fragment sowie Fälle bei denen die Wertung unklar war; dic+: ausschließlich dizentrische Chromosomen mit azentrischem Fragment; ins: Insertionen; inv: Inversionen; n.b.: nicht bestimmt; r: zentrische Ringe; t: Translokationen).

5.3.2. Vorkommen von „rogue“-Zellen

Bei der Auswertung der Chromosomenaberrationen wurde auch das Vorkommen von sogenannten „rogue cells“ dokumentiert (Kapitel 4.4.; Abbildung 4.5). Hierbei handelt es sich um Zellen mit einer abnorm hohen Aberrationsrate, wobei es keine einheitliche Definition gibt. Testard et al. (1996) bezeichnet Metaphasen unbestrahlter Proben mit mindestens 8 Aberrationen als „rogue cell“, hingegen spricht Neel (1998) von „rogue cells“ wenn mindestens 5 Austauschaberrationen vorliegen.

Anfang der 70iger Jahre wurden solch schwergeschädigte Zellen erstmals in PBLs von Yanomamma Indianer, die in Südamerika (Venezuela) leben, beschrieben (Bloom et al., 1970; Bloom et al., 1973). Seit dieser Zeit wurden Studien an unterschiedlichen Personengruppen weltweit durchgeführt, wie z.B. in Großbritannien (Tawn et al., 1985), Japan (Awa et al., 1978; Awa und Neel, 1986), Namibia (Zaire et al., 1997; Lloyd et al., 2001) sowie an Strahlenopfern von Tschernobyl (Sevan`kaev et al., 1993; Lazutka, 1996; Domracheva et al., 2000) und an Astronauten (Testard et al., 1996; Obe et al., 1997; Neel, 1998). Nachgewiesen wurden diese Zellen mit einer abnorm hohen Anzahl an Aberration in

PBLs sowohl von Kontrollpopulationen als auch von strahlenexponierten Personen. Als Ursprung werden mehrere auslösende Faktoren in Betracht gezogen, wie z.B. eine virale Infektion (Tawn et al., 1985; Neel et al., 1996; Neel, 1998) oder auch die Belastung durch kosmische Strahlung bzw. Schwerionen bei Astronauten während eines Langzeitaufenthaltes im Weltraum (Testard et al., 1996). Da diese schwergeschädigten Zellen auch bei Personen ohne ersichtliche Vorbelastung nachgewiesen werden konnten, ist die Frage des Ursprungs noch nicht schlüssig geklärt.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei der Auswertung von Metaphasen bei beiden Spendern (1 und 2) in unbestrahlten Proben diese Art von Zellen nachgewiesen werden. Da nur die Anzahl der ausgewerteten und nicht die Gesamtzahl der betrachteten Metaphasen genau dokumentiert wurde, kann die Frequenz an „rogue“-Zellen nur abgeschätzt werden und beträgt in den unbestrahlten Proben beider Spender ca. 1:500. In den bestrahlten Proben (1 bis 4Gy) konnten ebenfalls Zellen gefunden werden, deren ungewöhnlich hohe Anzahl an Aberrationen deutlich über dem Durchschnitt der jeweiligen Dosis lag. Die Frequenz betrug ca. 1:600 und zeigte somit keine Erhöhung im Vergleich zu der Anzahl in den unbestrahlten Proben, was die Vermutung nahe legt, dass diese „rogue“-Zellen nicht durch die experimentelle Bestrahlung induziert werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Ein Überblick zur Häufigkeit dieses Phänomens in verschiedenen Personengruppen ist bei Mustonen et al. (1998) dargestellt. Hierbei schwankt die Anzahl an „rogue“ Zellen in Kontrollen, die in mehreren Studien gemessen wurde, zwischen 1:36500 bis 1:400. Die höchste individuelle Frequenz die bisher nachgewiesen werden konnte liegt bei 1:50. Die hier nachgewiesenen prozentualen Anteile an „rogue cells“ liegen im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen recht hoch (Überblick in Mustonen et al. 1998). Diese Untersuchungen wurden jedoch meist ausschließlich 48h nach Stimulierung durchgeführt und die in der vorliegenden Arbeit gefundenen „rogue“-Zellen traten bis auf eine Ausnahme erst zu späteren Inkubationszeitpunkten (>60h) auf und die Frequenz verringert sich auf 1:4200 wenn die Auswertung auf 48h beschränkt wird. Inwieweit an deren Ursprung Kulturbedingungen beteiligt sind lässt sich nicht abschätzen. Eine eventuelle Vorbelastung der Blutspender, die dieses Phänomen erklären würde, ist nicht bekannt.

5.3.3. Dosis-Effekt-Kurven nach Röntgenbestrahlung

Um die Wirkung von dünnionisierender Strahlung auf PBLs unterschiedlicher Spender abzuschätzen, wurden Experimente mit Röntgenstrahlung durchgeführt. Weiterhin wurden sie als Referenzstrahlung für die Berechnung der RBW von Kohlenstoffionen benötigt.

In Abbildung 5.1 wurde die Anzahl dizentrischer Chromosomen sowie aller detektierbarer Aberrationen (dic, r, csb und dmin) in 100 PBLs nach Röntgenbestrahlung von Spender 1 (Kurve 1) und Spender 2 (Kurve 2) mit entsprechenden Dosis-Effekt-Kurven aus der Literatur verglichen. In PBLs von Spender 1 (Kurve 1) zeigt sich in beiden Fällen ein geringfügig höheres Aberrationsniveau im Vergleich zu Spender 2 (Kurve 2). Der Unterschied liegt jedoch im Bereich des Fehlers der Auswertung.

Wie Abbildung 5.1 (links) zeigt, liegen die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Dosis-Effekt-Kurven der beiden Spender für ausschließlich dizentrische Chromosomen im Bereich der Literaturdaten. Werden mehrere Aberrationstypen (dic, r, csb und dmin) in die Auswertung miteingeschlossen (Abbildung 5.1, rechts), so liegt das Aberrationsniveau sowohl in PBLs von Spender 1 als auch Spender 2 über den von anderen Arbeitsgruppen ermittelten Werten (Lloyd et al., 1975; Schmid et al., 1984; Barquinero et al., 1997). Die Unterschiede in den Dosis-Effekt-Kurven von PBLs verschiedener Blutspender nach

Röntgenbestrahlung können unterschiedlich begründet werden. Spezifische Laborbedingungen, wie z.B. Bestrahlungs- und Kulturbedingungen oder auch subjektive Faktoren beim Auswerten der Chromosomenpräparate können die erhaltenen Ergebnisse beeinflussen (Bianchi et al., 1982; Lloyd et al., 1988; Lloyd et al., 1992). Jedoch werden neben individueller Unterschiede in der Aberrationsrate (van Buul und Natarajan, 1980; Lloyd et al., 1988; Virsik-Peukert et al., 1997), auch zeitliche Schwankungen innerhalb eines Spenders diskutiert (Kakati et al., 1986; Ricoul et al., 1997).

Das hohe Aberrationsniveau in der vorliegenden Arbeit ist noch kein Hinweis auf einen individuellen Unterschied hinsichtlich der Reparatur von DNA-Schäden, sondern kommt sehr wahrscheinlich durch eine subjektive Bewertung von Chromosomenschäden zu Stande (Bianchi et al., 1982; Lloyd et al., 1988; Lloyd et al., 1992). Zum Beispiel beträgt in der vorliegenden Arbeit der Anteil an dizentrischen Chromosomen nach Röntgenbestrahlung 40 bis 50% der Gesamtzahl an Aberrationen (Kapitel 7.3., Tabellen 7.1 und 7.2 sowie 7.4 und 7.5), während in der Literatur Anteile von ca. 50 bis 70% für Dosen ab 1Gy beschrieben werden (Lloyd et al., 1975; Schmid et al., 1984; Barquinero et al., 1997). Vor allem azentrische Fragmente können durch ihre häufig geringe Größe übersehen werden oder Artefakte, die durch Verschmutzung der Präparate auftreten, werden versehentlich als Fragment gewertet. Daher unterliegt gerade die Messungen von azentrischen Fragmenten stark der individuellen Beurteilung der auswertenden Person. Aus diesem Grund beschränken sich viele Arbeitsgruppen auf die Untersuchung von dizentrischen Chromosomen oder zentrischen Ringen. Dies ist jedoch auch problematisch und wird im Kapitel 5.3.5. näher erläutert.

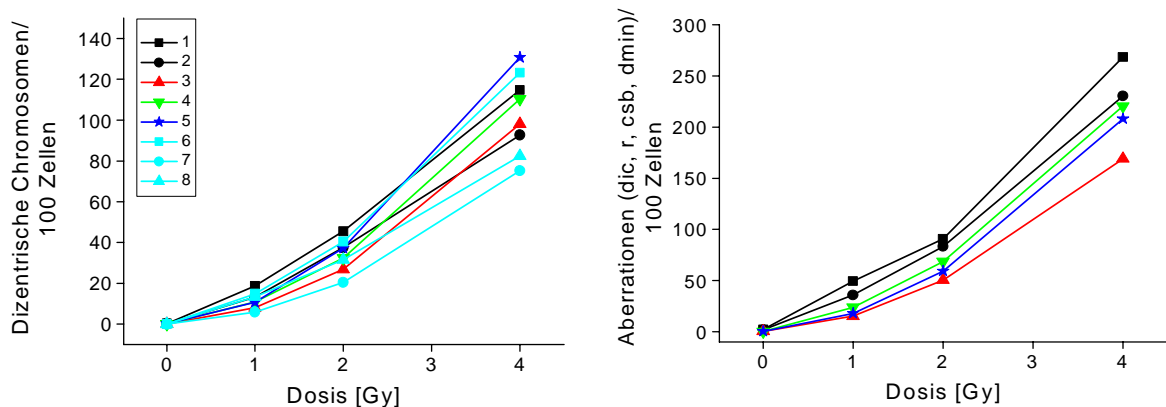


Abbildung 5.1: Anzahl an dizentrischen Chromosomen (links) und unterschiedlichen Aberrationen (rechts: dic, r, csb, dmin) in 100 Metaphasen von PBLs nach Röntgenbestrahlung und FPG-Färbung (Die Skalierung der y-Achse ist unterschiedlich). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden PBLs von Spender 1 (1) und 2 (2) bestrahlt und die erhaltenen Dosis-Effekt-Kurven mit Literaturdaten (3-8) verglichen. Die Dosis-Effekt-Kurven von Barquinero et al., 1997 (3; ein Spender), Schmid et al., 1984 (4; ein Spender), Lloyd et al., 1975 (5; Daten von PBLs mehrerer Spender wurden gepooled) und Virsik-Peukert et al., 1997 (6-8; jeweils ein Spender) wurden 48h nach Bestrahlung gemessen. Hingegen bestehen die Kurven 1 und 2 aus Mittelwerten von 4 Datenpunkten pro Dosis, die über einen Zeitraum von 48 bis 72h in zwei unabhängigen Röntgenexperimenten pro Spender gesammelt wurden.

Der Vergleich der Kurven zeigt neben deutlichen Unterschieden in der Aberrationsrate zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen jedoch auch, dass es individuelle Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit gibt. So konnten Virsik-Peukert et al. (1997) in drei Spendern (Abbildung 5.1, links; Kurven 6-8) im dargestellten Dosisbereich (0 bis 4Gy) Unterschiede vom Faktor 1,5 bis 3 nachweisen.

Diese Inter-Donor-Unterschiede wurden sowohl in PBLs (Abbildung 5.1, links; Kurven 6-8) als auch in den Hautfibroblasten der drei Spender gefunden. Auch die von van Buul und Natarajan (1980) sowie Kakati et al. (1986) nachgewiesenen Intra- und Inter-Donor-Unterschiede können nicht durch Schwankungen der Auswertung unterschiedlicher Labore erklärt werden, da die Messergebnisse im gleichen Labor gesammelt wurden. Auch das Auswerten der Chromosomenpräparate durch verschiedenen Personen und dadurch auftretende subjektive Unterschiede in der Bewertung von Aberrationen, begründet nicht die sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch von Kakati et al. (1986) und Virsik-Peukert et al. (1997) nachgewiesenen individuellen Schwankungen, da stets ein und dieselbe Person die Auswertung durchführte. Daher geben diese Untersuchungsergebnisse Hinweise auf eine intrinsische Strahlensensitivität einzelner Blutspender.

5.3.4. Dosis-Effekt-Kurven nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen geringen Unterschiede zwischen Spender 1 und 2 nach Röntgenbestrahlung, die im Bereich des Messfehlers lagen, wurden nach Bestrahlung der PBLs mit 400MeV/u Kohlenstoffionen erheblich deutlicher, sowohl bei der Entstehung ausschließlich dizentrischen Chromosomen (Abbildung 5.2; Kurve 1 und 2 sowie Kapitel 7.3.; Tabellen 7.3 und 7.4a, b) als auch bei der Anzahl aller Aberrationen (Kapitel 4.2.1.; Abbildung 4.1, unten). Da in der Literatur nur wenige Daten zur Bestrahlung mit hochenergetischen Kohlenstoffionen vorliegen, wurde der Vergleich auf andere Ionenstrahlen mit annähernd gleichem LET ausgeweitet. Die Gegenüberstellung der Messdaten wurde auf die Induktion von dizentrischen Chromosomen beschränkt (Abbildung 5.2), da von den Autoren unterschiedliche Aberrationsarten ausgewertet werden.

Der Vergleich der Daten der vorliegenden Arbeit mit denen von Ohara et al. (1998) für 135MeV/u Kohlenstoffionenbestrahlung (Abbildung 5.2; Kurve 6) zeigt, dass die Anzahl dizentrischer Chromosomen des untersuchten Blutspenders zwischen dem Niveau der beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten Spendern liegt (Abbildung 5.2; Kurve 1 und 2). Werden zusätzlich auch azentrische Fragmente in die Dosis-Effekt-Kurven mitaufgenommen, so zeigt sich ein ähnlich hohes Aberrationsniveau in PBLs des Blutspenders von Ohara et al. (1998) wie in Spender 1 der vorliegenden Arbeit (Daten nicht dargestellt). Nach Bestrahlung mit 5,9MeV/u Heliumionen (Abbildung 5.2; Kurve 3) wird in Untersuchungen von Edwards et al. (1986) eine ähnlich hohe Anzahl an dizentrischen Chromosomen sichtbar wie bei Ohara et al. (1998). Nach 5-12MeV/u Protonenbestrahlung liegt diese in PBLs (Abbildung 5.2; Kurve 4) von Schmid et al. (1997) bedingt durch den geringen LET von 4-8keV/ μ m erwartungsgemäß tiefer als alle anderen. Nach Bestrahlung mit 325MeV/u Sauerstoffionen (Abbildung 5.2; Kurve 5) von Testard et al. (1997) liegt die Aberrationsrate ausschließlich dizentrischer Chromosomen sichtbar höher als die von Spender 2 (Kurve 2), was auf den höheren LET von 21,7keV/ μ m zurückzuführen ist. Auffällig ist jedoch, dass in PBLs von Spender 1 (Kurve 1) die höchste Anzahl an dizentrischen Chromosomen im Vergleich zu den hier aufgeführten Dosis-Effekt-Kurven anderer Strahlenqualitäten auftritt, obwohl der LET von 400MeV/u Kohlenstoffionen mit 11KeV/ μ m vergleichsweise niedrig ist. Die geringe Anzahl nach Bestrahlung mit Heliumionen (Kurve 3), Sauerstoffionen (Kurve 5) und Kohlenstoffionen (Kurve 6), die alle einen höheren LET und zudem eine nahezu identische RBW im Vergleich zu den hier verwendeten Kohlenstoffionen aufweisen, bekräftigt die Vermutung, dass Spender 1 eine erhöhte individuelle Strahlensensitivität besitzt. Da diese Ergebnisse in unterschiedlichen Laboren von verschiedenen Personen erarbeitet wurden, hat die deutlich erhöhte Aberrationsrate in Spender 1 im Vergleich zu Spender 2 in der vorliegenden Arbeit eine stärkere Aussagekraft, da sie nicht von möglicherweise unterschiedlichen Auswerteverfahren beeinflusst wird.

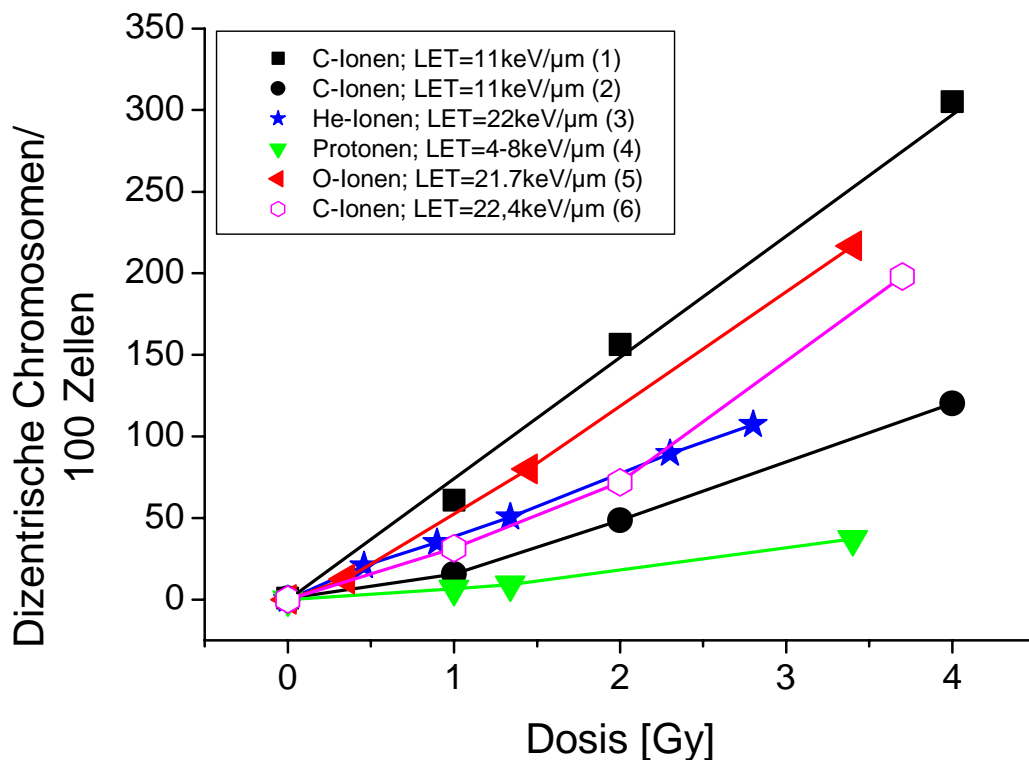


Abbildung 5.2: Anzahl an dizentrischen Chromosomen in 100 Metaphasen (PBLs) der 1. Mitose nach Ionenbestrahlung. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen Dosis-Effekt-Kurven der PBLs von Spender 1 (1) und 2 (2) nach Bestrahlung mit 400MeV/u Kohlenstoffionen wurden mit Literaturdaten (3-6) verglichen. Die Dosis-Effekt-Kurven von Edwards et al., 1986 (3; 5,9MeV/u Heliumionen), Schmid et al., 1997 (4; 5-12MeV/u Protonen, siehe Anmerkung Tabelle 5.2), Testard et al., 1997 (5; 325MeV/u Sauerstoffionen) und Ohara et al., 1998 (6; 135MeV/u Kohlenstoffionen) basieren auf Einzelmessungen zwischen 48 bis 53h nach Bestrahlung. Hingegen bestehen die Kurven 1 und 2 aus Mittelwerten von 3 bis 4 Datenpunkten pro Dosis, die über einen Zeitraum von 48 bis 96h gesammelt wurden.

5.3.5. Die relative biologische Wirksamkeit (RBW)

Um die biologische Effektivität unterschiedlicher Strahlenarten vergleichen zu können wurde die relative biologische Wirksamkeit (RBW) eingeführt, die bereits in den Kapiteln 2.5. und 4.3. näher beschrieben wurde. Da die RBW nicht nur vom betrachteten Endpunkt (hier z.B. Chromosomenaberrationen), sondern auch vom Schadensniveau abhängt (z.B. Weyrather et al., 1999; Berger, 2001), wird dieses im folgenden als Index angegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Metaphasen der 1. Mitose von PBLs nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen sowie 400MeV/u Kohlenstoffionen eine konstante Aberrationsrate gefunden und daher der Mittelwert aus den Daten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulierung erhalten wurden, errechnet und Dosis-Effekt-Kurven erstellt. Aus diesen Kurven wurden dann die RBW-Werte von 400MeV/u Kohlenstoffionen für die Anzahl aller Aberrationstypen beider Spender bestimmt. Für Spender 1 betrug die $RBW_{100} = 2,8$ bzw. $RBW_{200} = 2,3$ und für Spender 2, für den die Kohlenstoff- und Röntgenkurve identisch waren, war die $RBW = 1$ (Kapitel 4.3.; Abbildung 4.4).

Zeitlich konstante Aberrationsraten wurden auch von Scott und Lyons (1979) nach Röntgenbestrahlung gefunden, während Lloyd et al. (1977) und Anderson et al. (2000) einen

geringen zeitlichen Anstieg nachwies. Diese Tendenz wurde auch in humanen Fibroblasten (z.B. Füssel, 1997; Virsik-Peukert et al., 1997; Berger, 2001) sowie in einigen Zelllinien des chinesischen Hamsters (z.B. Nasonova et al., 1998) beobachtet. Für hochenergetische Teilchenstrahlen, wie sie in der vorliegenden Arbeit mit 400MeV/u Kohlenstoffionen (LET = 11keV/μm) verwendet wurden, fanden auch George et al. (2001a) nach Bestrahlung von PBLs mit 400MeV/u Neonionen (LET = 30keV/μm) keinen zeitlichen Anstieg der Aberrationsrate. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nach Nieder-LET-Bestrahlung ein Probenzeitpunkt ausreicht, an dem die Aberrationsrate bestimmt wird, um die RBW für die Teststrahlung zu berechnen.

Nach Hoch-LET-Teilchenbestrahlung zeigt sich ein zeitlicher Anstieg der Aberrationsrate in PBLs für LET-Werte über 100keV/μm (Anderson et al., 2000; George et al., 2001a). Dieser Anstieg wird in Untersuchungen von Hamsterzellen noch deutlicher (Ritter et al., 1992; Ritter et al., 1996; Scholz et al., 1998). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass nach Hoch-LET-Bestrahlung über einen längeren Zeitraum die Anzahl an Chromosomenaberrationen gemessen werden muss und anhand dieser Daten dann die RBW-Berechnungen vorgenommen werden. Ausschließlich frühe Sammelzeitpunkte führen nämlich zu einer Unterschätzung der Effektivität der Teststrahlung, wo hingegen nur späte eine Überschätzung zur Folge haben. Auch die Wahl der Aberrationsarten beeinflusst den RBW-Wert, da das Spektrum strahleninduzierter Aberrationstypen von der Strahlenqualität anhängt (Gerasimenko et al., 1980; Ritter et al., 1996; Ohara et al., 1998; Anderson et al., 2000). Mit zunehmendem LET kommt es zu einer höheren lokalen Schadensdichte und komplexen DNA-Schäden (Ward, 1985; Goodhead, 1989; Krämer und Kraft, 1994; Kraft et al., 1999), die von den Zellen nur schlecht repariert werden können (z.B. Goodwin et al., 1994; Heilmann et al., 1996; Durante et al., 1998). Dadurch entstehen mehr azentrische Fragmente und weniger Austauschaberrationen wie z.B. dizentrische Chromosomen. Wird nun die Auswertung nach Hoch-LET-Bestrahlung auf dizentrische Chromosomen beschränkt, kommt es zu einer Unterschätzung des strahleninduzierten Schadens (z.B. Nasonova et al., 2001).

Ein Vergleich der RBW-Werte (Tabelle 5.2) für 400MeV/u Kohlenstoffionen mit Literaturdaten ist nicht ohne weiteres möglich, da viele Publikationen zwar Dosis-Effekt-Kurven, aber keine expliziten RBW-Angaben enthalten. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurden daher zunächst aus den jeweiligen Dosis-Effekt-Kurven der vorliegenden Arbeit und der Literaturstellen die RBW-Werte für eine Photonen Äquivalenzdosis von 4Gy bestimmt. Dieses Schadensniveau wurde ausgewählt, da im niedrigen Dosisbereich die RBW-Werte in der Regel größere Fehler aufweisen. Für die Arbeiten, die nur die Dosis-Effekt-Kurven für Hoch-LET-Strahlen, aber keine Referenzkurven für Niedrig-LET-Strahlen enthalten, werden die Daten von Lloyd et al. (1975) zum Vergleich herangezogen (Werte in der Tabelle durch ein „^a“ gekennzeichnet).

Für ausschließlich dizentrische Chromosomen ergab sich aufgrund dieser Berechnungen eine RBW von 400MeV/u Kohlenstoffionen in PBLs der Spender 1 und 2 von 2,4 bzw. 1,1. Werden alle Aberrationen in die Berechnungen miteinbezogen betragen sie 2,1 bzw. 1 (Tabelle 5.2). Die RBW-Werte von Spender 2 stimmen gut mit denen, die von Wu et al. (1997) nach 290MeV/u Kohlenstoffionenbestrahlung erhalten wurden (1,1 bzw. 1,3), überein. Eine hohe RBW von 135MeV/u Kohlenstoffionen von 2,7 wurde von Ohara et al. (1998) beschrieben.

Obwohl die RBW vom biologischen Endpunkt abhängt (z.B. Berger, 2001), wurde bedingt durch die geringe Anzahl an Experimente, bei denen Chromosomendaten der RBW-Messung zugrunde liegen, der Vergleich mit Literaturdaten auf Messergebnisse aus Überlebenskurven anderer Zellsysteme ausgedehnt. Untersuchungen von Chromosomenaberrationen in

Hautfibroblasten nach Bestrahlung mit 200MeV/u Kohlenstoffionen ($LET = 16\text{keV}/\mu\text{m}$) von Berger (2001) zeigen eine RBW zwischen 1,5 und 1,9. Diese Werte wurden auch von Weyrather et al. (1999) für 270MeV/u Kohlenstoffionen ($LET = 13,7\text{keV}/\mu\text{m}$) in Überlebenskurven (10% Überlebensniveau) von CHO-K1- und V79-Zellen gemessen. Die RBW-Werte von 1,1 (dic) bzw. 1 (alle Aberrationen) für Spender 2 liegen im Bereich derer, die anhand von Überlebenskurven gemessen wurden (z.B. Weyrather et al., 1999; Berger, 2001). Die RBW von Kohlenstoffionen für Spender 2 und den Blutspender von Ohara et al. (1998) liegen deutlich über den vergleichbaren Messungen aus Überlebenskurven und können z.B. mit einer individuellen Strahlenempfindlichkeit der Spender zusammenhängen.

Weitere Messungen der RBW anhand Chromosomendaten von 23,5MeV Heliumionen mit einem der 400MeV/u Kohlenstoffionen ($11\text{keV}/\mu\text{m}$) ähnlichen LET (Tabelle 5.2) ergaben Werte von 1,9 bzw. 1,6 (Edwards et al., 1986). Dieser Anstieg läßt sich durch den erhöhten LET erklären. Höhere RBW-Werte ergaben sich bei Takatsuji und Sasaki (1984) mit 3,6 (He-Ionen) und 1,5 (Protonen), wobei hier aus Mangel einer Referenzkurve, die für Gammastrahlung von Lloyd et al. (1975) verwendet wurde. Dies kann die Genauigkeit der Berechnungen beeinflussen wie in Kapitel 5.3.3. näher erläutert wurde. Obwohl für Protonen (5-12MeV/u) bedingt durch den geringeren LET von $4\text{-}8\text{keV}/\mu\text{m}$ eine geringere RBW zu erwarten wäre, erscheint der Wert von 0,7 ungewöhnlich niedrig (Schmid et al., 1997). Die gemessenen RBW-Werte von Protonen und Heliumionen für Chromosomenschäden sind konsistent mit denen aus Überlebenskurven für Protonen in V79-Zellen (Belli et al., 1989) und für Heliumionen (Barendsen et al., 1963) in T1-Zellen (humane Nierenzellen).

Die Unterschiede zwischen den RBW-Werten der vorliegenden Arbeit und denen in der Literatur beschriebenen können durch mehrere Faktoren zu Stande kommen. Untersuchungen von Chromosomenschäden nach Bestrahlung werden häufig zu späteren Zeitpunkten als dem klassische 48h-Punkt vorgenommen. Wenn nicht mittels geeigneter Färbemethoden (z.B. FPG) sichergestellt wird, dass ausschließlich Metaphasen der 1. Mitose nach Bestrahlung ausgewertet werden, kann es zu einer Verdünnung mit zweiten und späteren Metaphasen kommen; dies führt zu einer Unterschätzung des strahleninduzierten Schadens bzw. der RBW der untersuchten Strahlenart. In Untersuchungen von Kolin-Gerresheim und Bauchinger (1981) lag z.B. der Anteil an Metaphasen in der 2. bzw. höheren Mitose, 48h nach Bestrahlung, in PBLs der einzelnen Spender zwischen 24 und 64%. Deutliche Unterschiede im Aberrationsspektrum der Test- und Referenzstrahlung (Ohara et al., 1998) können sowohl zu einer Unterschätzung als auch Überschätzung der RBW führen wenn die Berechnungen auf einzelne Aberrationstypen beschränkt werden (z.B. Nasonova et al., 2001). Weitere beeinflussende Faktoren wurden bereits in den vorangegangenen Kapiteln erläutert.

Der Vergleich der RBW von unterschiedlichen Teilchenstrahlen wird darüber hinaus von physikalischen Faktoren beeinflusst, denn Teilchen unterschiedlicher Ordnungszahl haben bei gleichem LET eine unterschiedliche RBW (Abbildung 5.3). Dies führt dazu, dass z.B. Protonen bei gleichem LET eine höhere RBW als Heliumionen aufweisen, da die Bahnspur bedingt durch die geringere Energie enger und somit die lokale radiale Energiedeposition höher ist. Die RBW ist also nicht nur vom LET sondern auch von der Energie des verwendeten Teilchenstrahls abhängig.

Die deutlichen Abweichung zwischen Spender 1 und Spender 2 lassen sich nicht durch experimentelle Unterschiede erklären. Da auch die Kulturbedingungen standardisiert und die Auswertung der Chromosomenaberrationen von einer Person vorgenommen wurde, haben 400MeV/u Kohlenstoffionen eine erhöhte biologische Wirkung auf die Induktion von Chromosomenaberrationen in PBLs von Spender 1 im Vergleich zu denen von Spender 2. Diese Tendenz wurde auch bei den Dosis-Effekt-Kurven nach 400MeV/u

Kohlenstoffionenbestrahlung sichtbar, wo PBLs von Spender 1 eine deutlich höhere Aberrationsrate aufwiesen als die von Spender 2. Inwieweit dies auf eine Strahlensensitivität von Spender 1 bzw. auf eine effektivere Reparaturkapazität von Spender 2 zurückzuführen ist oder ob Faktoren, die die Aberrationsrate beeinflussen könnten, hieran beteiligt sind, soll im folgenden näher diskutiert werden.

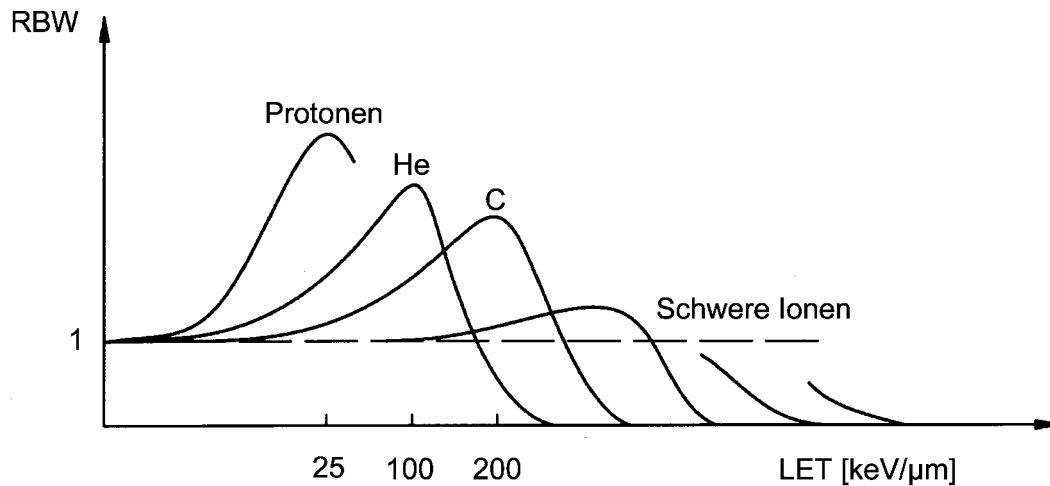


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der RBW als Funktion des LETs in Abhängigkeit von der verwendeten Ionensorte (aus Kraft et al., 1999).

Bestrahlung	LET [keV/μm]	RBW		Autoren
		dic	alle Aberrationen	
23MeV/u He-Ionen	30	3,6 ^a	n.u.	Takatsuji und Sasaki, 1984
4,9MeV/u Protonen	8,3	1,5 ^a	n.u.	
5,9MeV/u He-Ionen	22	1,9 ^a	1,6 ^a	Edwards et al., 1986
5-12MeV/u Protonen	4-8	0,7	n.u.	Schmid et al., 1997*
290MeV/u C-Ionen	13	1,1	1,3	Wu et al., 1997
135MeV/u C-Ionen	22,4	2,7 (dic + r)	n.u.	Ohara et al., 1998
400MeV/u C-Ionen	11	2,4 (Spender 1) 1,1 (Spender 2)	2,1 (Spender 1) 1 (Spender 2)	vorliegende Arbeit, 2002

Tabelle 5.2: Relative biologische Wirksamkeit (RBW) von unterschiedlichen Ionenstrahlen für die Induktion von dizentrischen Chromosomen (dic) bzw. der Gesamtzahl aller Aberrationsarten in PBLs. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte von 400MeV/u Kohlenstoffionen der Spender 1 und 2 wurden mit Literaturdaten verglichen. (a: Referenzkurve von Lloyd et al., 1975; LET: Linearer Energietransfer; n.u.: nicht untersucht). *: bedingt durch die hohe Schichtdicke der bestrahlten Probe wurden die Grenzwerte für die Energie und den entsprechenden LET berechnet (Schwab, 1991).

5.4. Die Aberrationsrate beeinflussende Faktoren

Da die Auswertung von Chromosomenschäden durch mehrere biologische Parameter beeinflusst werden kann, wurden folgende in der vorliegenden Arbeit gemessen: Mitoseindex, die Verteilung der Metaphasen in der 1., 2. bzw. ≥ 3 . Mitose nach Bestrahlung, der prozentuale Anteil stimulierter PBLs und die Induktion von Apoptose. Aus zeitlichen Gründen war es nicht immer möglich alle Messungen parallel durchzuführen, daher wurde die Stimulation und die Induktion der Apoptose nach Röntgen- bzw. Kohlenstoffionenbestrahlung mehrmals gemessen, um individuelle Unterschiede zwischen den Spendern zu überprüfen. Jedoch können zeitliche Schwankungen bezüglich der Messung dieser Parameter innerhalb der Spender 1 und 2 die Abschätzung des Einflusses dieser Faktoren erschweren. Die Effekte, die bei den Untersuchungen der verschiedenen biologischen Parameter auftraten, sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Strahlung	biologische Parameter	Zeit nach Bestrahlung	Dosis	Intra-Donor-Variabilität	Inter-Donor-Variabilität
Röntgenstrahlung	Aberrationsrate	Nein	Ja	Nein	Nein
	Mitoseindex	Ja	Ja	Ja	Ja
	Verteilung der Mitosen	Ja	Ja	Ja/Nein	Ja
	Stimulierung (Ki67-Test)	Gering	gering	Ja	Nein
	Apoptoserate (ApoNexin-Test)	Ja	Ja	Aussage nicht möglich	Aussage nicht möglich
400MeV/u Kohlenstoffionen	Aberrationsrate	Nein	Ja	n.u.	Ja
	Mitoseindex	Ja	Ja	Ja	Ja
	Verteilung der Mitosen	Ja	Ja	n.u.	Nein
	Stimulierung (Ki67-Test)	Ja	Ja	n.u.	n.u.
	Apoptoserate (ApoNexin-Test)	Ja	Ja	Aussage nicht möglich	Aussage nicht möglich

Tabelle 5.3: Zusammenfassung der Effekte, die in den untersuchten biologischen Parametern der PBLs nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und 400MeV/u Kohlenstoffionen gemessen wurden (n.u.: nicht untersucht).

5.4.1. Einfluss von Zellzyklusverzögerungen

Ein Anstieg der Aberrationsrate über die Zeit wurde in keinem der durchgeführten Experimente sichtbar (Abbildung 4.1), obwohl die dosisabhängige Reduktion des Mitoseindex (Abbildung 4.7, links) und die Verzögerung beim Erreichen der Mitose nach Bestrahlung (Abbildung 4.10 und Abbildung 4.11) dies zunächst vermuten ließ. Neben der Aberrationsrate war auch der Anteil an aberranten Zellen über den Untersuchungszeitraum in den einzelnen Dosisbereichen konstant, so dass die dosisabhängigen Veränderungen der Zellproliferation wahrscheinlich mit einem abweichenden strahlenbiologischen Verhalten der Subpopulationen von T-Lymphozyten zusammenhängen. Unterschiede im strahlenbiologischen Verhalten von Subpopulationen der PBLs (Kapitel 5.4.3.) konnten bereits für mehrere biologische Parameter nachgewiesen werden (Schwartz und Gaulden,

1980; Stewart et al., 1988; Menz et al., 1997; Kern et al., 1999). Für unterschiedliche Proliferationsverhalten von Subpopulationen spricht auch das in der vorliegenden Arbeit beobachtete Phänomen, dass Zellen der Kontrollen über einen langen Probenzeitraum (48 - 96h) die 1. Mitose nach Stimulierung erreichen.

Eine zeitlich stabile Aberrationsrate in PBLs wird auch von anderen Autoren sowohl nach Röntgenbestrahlung (Scott und Lyons, 1979; Lloyd et al., 1977; Anderson et al., 2000) als auch nach Teilchenbestrahlung mit niedrigem LET (George et al., 2001a) gefunden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nach Exposition von PBLs mit Röntgen- und nieder-LET-Teilchenstrahlen es unerheblich ist, zu welchem Zeitpunkt nach Bestrahlung Chromosomenpräparate angefertigt werden, soweit durch geeignete Färbemethoden sichergestellt ist, dass ausschließlich Metaphasen der 1. Mitose nach Bestrahlung ausgewertet werden. Eine Verdünnung mit Zellen in der 2. bzw. ≥ 3 . Mitose zu späten Untersuchungszeitpunkten nach Bestrahlung würde dazu führen, dass der strahlenbiologische Schaden unterschätzt wird.

Nachdem beide Spender nach Röntgenbestrahlung annähernd identische Aberrationsraten aufwiesen, war es überraschend, dass nach Bestrahlung mit 400MeV/u Kohlenstoffionen Spender 1 eine um den Faktor ca. 2,5 höhere Aberrationsrate zeigte als Spender 2 (Kapitel 4.2.1.; Abbildung 4.1). Wird der Mitoseindex und die Verteilung der Metaphasen in der 1., 2. und ≥ 3 . Mitose nach Bestrahlung der beiden Schwerionexperimente verglichen, zeigt sich ein höherer Mitoseindex in Spender 1 im Vergleich zu Spender 2 über den gesamten Dosisbereich und Untersuchungszeitraum (Kapitel 7.3.; Tabellen 7.3 und 7.6). Anscheinend treten eine größere Anzahl an PBLs von Spender 1 in den Zellzyklus ein (Kapitel 5.4.2.). Die Verteilung der Metaphasen nach Bestrahlung zeigt jedoch bei beiden Spendern keine Unterschiede (Kapitel 4.7.1.; Abbildung 4.11), somit ist das Fortschreiten der PBLs im Proliferationszyklus nahezu identisch.

Der prozentuale Anteil der Zellpopulation, der bis zu einem bestimmten Zeitpunkt der Probennahme die 1. Mitosen nach Bestrahlung erreicht hat, kann durch eine Analyse der Daten nach Scholz et al. (1998) bestimmt werden. Dies war jedoch bei den Datensätzen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da bereits Zellen vor der ersten Probennahme (48h) die 1. Mitose nach Bestrahlung passiert hatten wie z.B. in Abbildung 4.10 deutlich wird.

5.4.2. Einfluss der Stimulierungsrate

Die Stimulierung (Ki67-Test) der PBLs zeigte in keinem der Spender nach Röntgenbestrahlung eine signifikante Zeit- oder Dosisabhängigkeit im untersuchten Zeitraum (30 bis 55h) bzw. Dosisbereich (0 bis 4Gy). Nach Bestrahlung mit 100 bzw. 400MeV/u Kohlenstoffionen hingegen wurden sowohl deutliche Zeit- als auch Dosiseffekte in den einzelnen Blutspendern sichtbar (Abbildung 4.12). Dieser Unterschied zwischen den beiden Strahlenarten wurde auch innerhalb eines Spenders sichtbar (Abbildung 4.12, oben). Ein Zeiteffekt sollte zu frühen Zeitpunkten bei beiden Strahlenarten auftreten, da sich die PBLs zunächst in einer Ruhephase befinden und erst nach Zugabe des Mitogens PHA die Proliferation der Zellen eingeleitet wird. Da es sich nicht um einen abrupten sondern allmählichen Anstieg des Anteils stimulierter PBLs handelt (Abbildung 4.12, rechts), läßt sich durch die Tatsache erklären, dass die Lymphozyten aus unterschiedlichen Subpopulationen bestehen, die ein abweichendes Stimulierungsverhalten aufweisen (z.B. Schwartz und Gaulden, 1980), d.h. B-Lymphozyten treten zu einem späteren Zeitpunkt in die G₁-Phase ein als T-Lymphozyten (Kapitel 2.3.). Unterschiede im Stimulierungsverhalten von Subpopulationen der T-Lymphozyten können nur vermutet werden, da bisher keine

Messungen zu diesem Thema vorliegen. Jedoch wurden bereits Unterschiede in den Subpopulationen der T-Lymphozyten hinsichtlich der Induktion von Apoptose (Kapitel 5.4.3.) nachgewiesen (Menz et al., 1997; Kern et al., 1999). Dies erklärt jedoch nicht warum zum gleichen Probenzeitpunkt nach Kohlenstoffionenbestrahlung eine deutlich geringere Anzahl an stimulierten PBLs gefunden wurde als nach Röntgenbestrahlung (Abbildung 4.12). Die Strahlenqualität hat also Einfluß auf das Stimulierungsverhalten der PBLs und die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen hemmt zunächst den Eintritt in die Proliferationsphase. Da dieser zeitliche Effekt auch in unbestrahlten Proben sichtbar wird lag der Verdacht nahe, dass zusätzlich auch die Bestrahlungsbedingungen einen Einfluß auf die Stimulierbarkeit der PBLs haben (Kapitel 3.6.) oder eine zeitliche Veränderung (Intra-Donor-Effekt) des Stimulierungsverhaltens der PBLs eines Spenders vorliegt (Tabelle 5.3). Da die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen in Kryoröhrchen durchgeführt wurde und nicht in Zellkulturflaschen, könnten Faktoren wie Sauerstoffmangel und pH-Wertänderung diesen Unterschied erklären. Jedoch konnten diese Vermutungen in einem weiteren Test mit PBLs von Spender 1 nicht bestätigt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Der Dosis-Effekt, der nur nach 400MeV/u Kohlenstoffionenbestrahlung deutlich wird, ist jedoch ein weiterer Hinweis dafür, dass die Strahlenqualität einen Einfluß auf das Stimulierungsverhalten der PBLs hat. Schließlich wurde die Auswertung der Anzahl stimulierter PBLs auf 45h nach Bestrahlung beschränkt, da zu späteren Zeitpunkte eine Verdünnung des unstimulierten Anteils an PBLs durch Tochterzellen der stimulierten Zellen zu Stande kommt.

Um zu überprüfen ob auch Zellen in der G₀-Phase bereits nach Markierung mit dem Ki67-Antikörpers positiv erscheinen, wurden PBLs von Spender 1 und 2 nach Röntgenbestrahlung parallel mit dem Anti-BrdU-Test ausgewertet. Nach Zugabe des Anti-BrdU-Antikörpers erscheinen alle Zellen die mit der ersten DNA-Replikation nach Stimulation begonnen oder sie vollendet haben positiv, währenddessen nach Zugabe des Anti-Ki67-Antikörpers bereits Zellen in der späten G₁-Phase (Gerdes et al., 1984) bzw. frühen S-Phase (Lopez et al., 1991) markiert werden. Bei beiden Blutspendern liegt der positive Anteil an PBLs nach Markierung mit dem Ki67-Antikörper deutlich höher als nach Markierung mit dem BrdU-Antikörper (Kapitel 4.8.1.) und bestätigt, dass durch den Anti-Ki67-Antikörper auch Zellen in der G₁-Phase markiert werden. Bei dem Anteil an unstimulierten PBLs handelt es sich wahrscheinlich um B-Lymphozyten sowie um einen geringen Anteil an T-Lymphozyten, der nicht stimuliert werden kann.

Systematische Studien zur Stimulierungsaktivität liegen nur begrenzt vor. Arbogast et al. (1999) konnten beim Vergleich zweier Altersgruppen (jünger als 35 Jahre und älter als 80 Jahre) eine geringere Stimulierungs- bzw. Proliferationsaktivität bei älteren Menschen nachweisen, die mit einer Reduktion der CDK6-Aktivität korreliert. Jedoch waren die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Spender mit 34 bis 51 Jahren annähernd gleichen Alters und die Spender 1 und 2, bei denen DNA-Schäden untersucht wurden, waren beide im Untersuchungszeitraum 40 bis 44 Jahre alt. Schwankungen in der Stimulierbarkeit der PBLs wurden auch in Astronauten nach Weltraummissionen gefunden. Jedoch war der Mitoseindex so gering, dass eine Auswertung von Metaphasen nicht möglich war (Yang et al., 1997).

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass noch nicht ausreichend Daten vorliegen, um eine Aussage hinsichtlich individueller Unterschiede im Stimulierungsverhalten der PBLs verschiedener Spender zu machen. Innerhalb der einzelnen Spender variierte der Anteil an stimulierten PBLs nach Röntgenbestrahlung deutlich, jedoch war die Schwankungsbreite der Stimulierungsraten in Spender 1 und 2 ähnlich (Kapitel 4.8.2.; Abbildung 4.13). Eine ausgeprägtere dosisabhängige Reduktion der Stimulation in den mit 400MeV/u Kohlenstoffionen bestrahlten Proben von Spender 2 im Vergleich zu Spender 1 könnte eine Verringerung der Aberrationsrate erklären.

5.4.3. Einfluss des apoptotischen und nekrotischen Zelltodes

Der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen (ApoNexin-Test) zeigt bei beiden verwendeten Strahlenarten eine Zeit- und Dosisabhängigkeit in stimulierten PBLs (Abbildung 4.14). Da es in den Kontrollen von PBLs der vorliegenden Arbeit über die Zeit ebenfalls zu einer Erhöhung der Apoptoserate kommt, scheinen auch die Kulturbedingungen Apoptose zu induzieren. Die deutliche Erhöhung nach Kohlenstoffbestrahlung im Vergleich zur Röntgenbestrahlung ist ein Hinweis, dass die Strahlenqualität nicht nur auf die Stimulierung sondern auch auf die Apoptose einen Einfluß hat und PBLs scheinbar strahlenempfindlicher gegenüber Teilchenstrahlen hinsichtlich der Induktion von Apoptose sind.

Untersuchungen der Apoptoserate nach Stimulierung liegen nur vereinzelt vor. Carloni et al. (2001) konnten hierbei keine dosisabhängige Veränderung nach Röntgenbestrahlung feststellen. Ein Anstieg über die Zeit und die Dosis wurde dagegen in unstimulierten PBLs von Boreham et al. (1996), Menz et al. (1997), Meijer et al. (1998), Kern et al. (1999) und Carloni et al. (2001) gezeigt.

Die Messung der Apoptose läßt durch die Schwankungen innerhalb eines Spenders und die nicht ausreichende Anzahl an Datensätzen keine Aussage bezüglich individueller Unterschiede in der Strahlensensitivität der Blutspender zu und somit kann auch der Einfluss auf die Aberrationsrate nicht schlüssig geklärt werden. Eine erhöhte Apoptoserate in Zellen von Spender 2 könnte zum Beispiel die geringere Aberrationsrate nach Bestrahlung mit 400MeV/u Kohlenstoffionen erklären (Abbildung 4.1), da hier ein Verlust vornehmlich schwergeschädigter Zellen zu erwarten ist, da der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen mit der Dosis anstieg. Individuelle Schwankungen in der Apoptoserate wurden darüber hinaus von Boreham et al. (1996) und Crompton et al. (2001) in unstimulierten PBLs gefunden.

Ein Unterschied in der prozentualen Zusammensetzung an Subpopulationen der PBLs in den einzelnen Spendern kann ebenfalls eine Auswirkung auf die Apoptoserate und folglich auch auf die Anzahl an Chromosomenaberrationen haben wenn diese Subpopulationen intrinsische Schwankungen bei der Induktion der Apoptose unterliegen. Messungen hierzu an Subpopulationen von T-Lymphozyten, d.h. CD4⁺-, CD8⁺- und CD19⁺-Zellen, von Menz et al. (1997) und Kern et al. (1999) zeigen nur geringe Unterschiede zwischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten nach Röntgenbestrahlung, jedoch eine Erhöhung der Sensitivität in CD19⁺-Zellen (Kern et al., 1999).

5.4.4. Einfluss individueller bzw. physiologischer Faktoren

Nachdem sich die erhöhte Aberrationsrate in PBLs von Spender 1 nach Bestrahlung mit 400MeV/u Kohlenstoffionen bisher nicht schlüssig durch Unterschiede in der Zellproliferation, der Stimulationsrate sowie der Induktion der Apoptose erklären läßt (Kapitel 5.4.), weist dies auf eine intrinsische Strahlensensitivität hin. Eine Wiederholung der Röntgenexperimente zeigte keine Unterschiede in der Aberrationsrate von Spender 1 und 2 (Abbildung 4.2). Jedoch liegen für beide Spender nur jeweils zwei unabhängige Experimente vor und eine Wiederholung der Schwerionenbestrahlung war aus zeitlichen Gründen nicht möglich. Daher sollte nicht ausschließlich von einem Inter-Donor-Effekt ausgegangen und ein Intra-Donor-Effekt von vorne herein ausgeschlossen werden, denn auch in der Literatur finden sich Hinweise auf eine sich zeitlich ändernde Strahlensensitivität wie der Überblick in Tabelle 5.4 zeigt.

Kakati et al. (1986) zeigten neben deutlichen Inter-Donor-Unterschieden auch Intra-Donor-Unterschiede und zwar wurden PBLs eines Spenders in vier unabhängigen Experimenten

verwendet. In zwei der vier Messungen war die Aberrationsrate doppelt bis dreifach so hoch wie in den beiden anderen. Ricoul et al. (1997) fanden nach in vitro Gammabestrahlung in PBLs von Schwangeren mehr Brüche als bei Nichtschwangeren sowie Schwankungen über den Zeitraum der Schwangerschaft bis zu einem Faktor von 4 innerhalb der einzelnen Frauen. Diese Unterschiede sind vermutlich hormonell bedingt, da der Anstieg des Progesteron- und Östrogenlevels im Blut von Schwangeren mit einer erhöhten Strahlensensibilität korrelierte. Da es auch außerhalb einer Schwangerschaft zu Hormonschwankungen im Körper kommt und es sich bei beiden untersuchten Blutspendern in der vorliegenden Arbeit um Frauen handelt, kann dieser Faktor auch die hier gemessenen Aberrationsraten beeinflusst haben. Die Auswirkungen der Konzentration des Steroidhormons Östradiol im Zellkulturmedium auf die Aberrationsrate in PBLs nach Röntgenbestrahlung wurden von Kanda und Hayata (1999) untersucht. Hierbei wurde z.B. bei einer eintägigen Vorinkubation der PBLs in Medium mit einer Östradiolkonzentration von 100ng/ml und anschließender Röntgenbestrahlung (3Gy) eine um 20% höhere Anzahl an Aberrationen (dic + r) im Vergleich zur Kontrolle ohne Östradiolzugabe gefunden.

In diesem Zusammenhang werden mehrere weitere Möglichkeiten für den Anstieg der Anzahl an DNA-Schäden durch die hohe Östradiolkonzentration diskutiert. Neben einer direkten Erhöhung der Aberrationsrate wird auch die Reduktion der Reparaturkapazität und der Apoptose in Betracht gezogen (Überblick Kanda und Hayata, 1999).

5.5. Möglichkeiten und Grenzen einer biologischen Dosimetrie

In der Literatur kommt es zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Untersuchung von Chromosomenschäden hinsichtlich Intra- und Inter-Donor-Variationen, die in Tabelle 5.4 aufgelistet wurden. Wie Tabelle 5.4 zeigt wurde nur in wenigen Studien eine Wiederholung eines Experimentes mit identischen Blutspender durchgeführt, die eine Aussage hinsichtlich der Stabilität der Strahlensensitivität innerhalb eines Spenders ermöglicht.

Unabhängig davon, ob die beschriebenen Unterschiede in der Aberrationsrate durch Intra- oder Inter-Donor-Schwankungen zu Stande kommen, erschweren sie die Erstellung von Eichkurven und verringern die Genauigkeit der Abschätzung einer erhaltenen Strahlendosis.

Schwankungen in der Strahlenempfindlichkeit einzelner Spender wurden von van Buul und Natarajan (1980), Kakati et al. (1986), Ricoul et al. (1997) sowie Wojcik und Streffer (1998) nachgewiesen. Nach Bestrahlung der PBLs mit Röntgen- und Gammastrahlung kam es zu deutlichen Unterschieden in den Aberrationsraten von 25 bis 300%. Zusätzlich wurden in diesen Arbeitsgruppen mit Ausnahme von Wojcik und Streffer (1998) auch Unterschiede der Strahlenempfindlichkeit zwischen den einzelnen Blutspendern nachgewiesen. Solche Inter-Donor-Effekte wurden auch von Lloyd et al. (1988), Virsik-Peukert et al. (1997) und Vorobtsova et al. (2001) nach Röntgen- bzw. Gammabestrahlung beschrieben. Lloyd et al. (1988) führen diese Unterschiede nicht zwingend auf eine individuelle Strahlensensibilität zurück und konnten sie in den darauffolgenden Jahren in weiteren Untersuchungen nicht bestätigen (Lloyd et al., 1992). Vorobtsova et al. (2001) fand in PBLs von Krebspatienten Schwankungen in der Anzahl an DNA-Schäden. Keine bzw. nur geringe Unterschiede (< 25%) in der Aberrationsrate verschiedener Blutspendern zeigten sich bei Untersuchungen mit dünnionisierender Strahlung bei Sharpe et al. (1969), Scott und Lyons (1979), Schmid et al. (1984), Fabry et al. (1985), Fabry und Lemaire (1986), Lindholm et al. (1998) und Stronati et al. (2001). Für alle hier aufgeführten Untersuchungen bis auf die von Vorobtsova et al. (2001) wurden PBLs von gesunden Spendern verwendet. Vorobtsova et al. (2001) analysierte die

Anzahl an Chromosomenschäden in PBLs von Krebspatienten und konnte keine Korrelation mit dem Alter erkennen.

Die Anzahl, der nach Bestrahlung gemessenen Chromosomenschäden, kann darüber hinaus auch durch weitere Faktoren beeinflusst werden, wie schon in Kapitel 5.4. erwähnt (Überblick Lloyd und Purrott, 1981). Untersuchungen zeigten geringe (Stronati et al., 2001) sowie deutliche Unterschiede bis zu einem Faktor von 3 in der Aberrationsrate von PBLs (Bianchi et al., 1982; Lloyd et al., 1988; Lloyd et al., 1992), wenn Chromosomenpräparate eines Experimentes in verschiedenen Laboren ausgewertet wurden. Als Gründe für diese Schwankungen werden unterschiedliche Kulturbedingungen, die Qualität der Chromosomenpräparation und subjektive Unterschiede bei der Bewertung der Aberrationen durch die auswertende Person diskutiert. Diese Faktoren können jedoch bei Messungen innerhalb eines Labors minimiert werden, wenn standardisierte Kulturbedingungen sowie Methoden verwendet werden und die Auswertung der Präparate durch geschultes Personal bzw. ein und die selbe Person durchgeführt wird.

Anzahl Spender	Färbe-Technik	Aberrationsrate		Autoren
		Intra-Donor-Effekt	Inter-Donor-Effekt	
7	Giemsa	n.u.	kein Effekt	Sharpe et al., 1969
4	FPG	geringer Effekt	geringer Effekt	Scott und Lyons, 1979
4	FPG	deutlicher Effekt	deutlicher Effekt	van Buul und Natarajan, 1980
2	FPG	n.u.	geringer Effekt	Schmid et al., 1984
2	FPG	n.u.	kein Effekt	Fabry et al., 1985
3	FPG	n.u.	kein Effekt	Fabry und Lemaire, 1986
3	FPG	deutlicher Effekt	deutlicher Effekt	Kakati et al., 1986
4	FPG	n.u.	geringer Effekt	Lloyd et al., 1988
24	FPG	n.u.	kein Effekt	Lloyd et al., 1992
17	Giemsa	deutlicher Effekt	deutlicher Effekt	Ricoul et al., 1997
3	FISH	n.u.	deutlicher Effekt	Virsik-Peukert et al., 1997
2	FISH	n.u.	kein Effekt	Lindholm et al., 1998
2	FISH FPG	deutlicher Effekt	kein Effekt	Wojcik und Streffer, 1998
4	FISH	geringer Effekt	geringer Effekt	Stronati et al., 2001
5	FISH Giemsa	n.u.	deutlicher Effekt	Vorobtsova et al., 2001

Tabelle 5.4: Übersicht der in der Literatur beschriebenen Intra- und Inter-Donor-Effekte hinsichtlich der Entstehung von strahleninduzierten Chromosomenaberrationen (FISH: Fluoreszenz in situ Hybridisierung, FPG: Fluoreszenz plus Giemsa-Färbung, n.u.: nicht untersucht).

Individuelle Faktoren lassen sich jedoch nicht reduzieren, wie z.B. der Umfang, in dem die Zelle auf strahleninduzierte DNA-Schäden mit Apoptose reagiert. Dieser könnte sich in den untersuchten Personen ändern, sowie die Stimulierung und Proliferationsaktivität der PBLs. Solche Schwankungen wurden zum Teil auch in der vorliegenden Arbeit deutlich, jedoch ließen die Ergebnisse keine eindeutige Schlüsse zum Verhalten der PBLs einzelner Spender hinsichtlich einer Sensitivität bzw. Resistenz zu. Es werden auch der sich ändernde physiologische Zustand der Spender sowie Unterschiede in der prozentualen Verteilung an Subpopulationen von PBLs mit unterschiedlicher Strahlensensitivität diskutiert (van Buul und Natarajan, 1980; Kakati et al., 1986) und wurden von Ricoul et al. (1997) bestätigt.

Mit derartigen Problemen werden nicht nur Personen konfrontiert, die sich mit der Erstellung von Eichkurven für Chromosomendaten, die aus *in vitro* Bestrahlungsexperimenten hervorgehen, beschäftigen. Auch die Messung von Aberrationsraten in PBLs nach *in vivo* Bestrahlung eines Strahlenopfers oder Patienten und die Abschätzung der empfangenen Strahlendosis werden von diesen Faktoren beeinflusst. Solche Untersuchungen werden jedoch durch ein weiteres Problem erschwert. Bei Strahlenunfällen oder im Rahmen einer Strahlentherapie wird in der Regel nur ein Teil des Körpers bestrahlt. Dies hat zur Folge, dass auch nur ein Teil der PBLs bestrahlt wird. Nach der Bestrahlung kommt es zu einer Durchmischung von geschädigten und ungeschädigten Zellen. Durch eine gemeinsame Kultur von bestrahlten und unbestrahlten Zellen wird versucht solche *in vivo* Teilkörperbestrahlungen *in vitro* zu simulieren (z.B. Guerro-Carbajal et al., 1998). Es ist jedoch bisher nicht schlüssig geklärt ob geschädigte und ungeschädigte PBLs während der Zirkulation im Blut identische Aufenthaltswahrscheinlichkeiten aufweisen (z.B. Huber et al., 1999). Sollten bevorzugt geschädigten PBLs aus dem zirkulierenden Blut eliminiert werden, würde eine Blutentnahme, die einige Zeit nach der Strahlenexposition stattfindet, eine Unterschätzung des biologischen Schadens zur Folge haben (Lloyd und Purrott, 1981). Auch hier würde die Apoptose eine zentrale Rolle spielen, insbesondere wenn sie individuellen Schwankungen unterliegt (Crompton et al., 2001). Darüber hinaus weisen PBLs in der Ruhephase (G_0 -Phase), in der sie sich im Körper überwiegend befinden, eine erhöhte Apoptoserate im Gegensatz zu proliferierenden Zellen auf (Carloni et al., 2001).

5.6. Einsatz der biologischen Dosimetrie

Trotz der Faktoren, die die Genauigkeit einer biologischen Dosimetrie beeinflussen können, wird sie parallel bzw. ergänzend zur physikalischen Dosimetrie eingesetzt. In den meisten Fällen steht nicht eine exakte Abschätzung der Strahlendosis sondern eine Abschätzung des erhöhten Strahlenrisikos z.B. für die Induktion von Krebs im Vordergrund und zwar im Zusammenhang mit Arbeits- und Strahlensicherheit (z.B. Edwards, 2001). Untersuchungen werden in erster Linie in Bereichen vorgenommen, in denen Personen wie z.B. Astronauten (Testard et al., 1996; Obe et al., 1997; Yang et al., 1997; Testard und Sabatier, 1999; Wu et al., 2000; Durante et al., 2001; George et al., 2001b) oder Arbeiter (Lazutka, 1996; Zaire et al., 1997; Domracheva et al., 2000; Lloyd et al., 2001) durch die Ausübung ihres Berufs einer erhöhten Strahlenbelastung ausgesetzt sind. In einer dieser Studien kamen die Autoren zu dem Schluss, dass es durchaus sinnvoll ist z.B. für Astronauten im Vorfeld eines Langzeitaufenthaltes im Weltraum individuelle Eichkurven zu erstellen, um die Genauigkeit der Abschätzung des strahlenbiologischen Schadens zu verbessern (Testard und Sabatier, 1999).

Werden in Langzeitstudien die Aberrationsraten in PBLs von strahlenexponierten Personen, wie z.B. den Überlebenden der Atombombenabwürfe (Awa et al., 1978; Awa und Neel, 1986; Nakano et al., 2001) oder Opfer von Strahlenunfällen (Sevan`kaev et al., 1993; Bauchinger, 1995; Lazutka, 1996; Lindholm et al., 1996; Bauchinger et al., 2001; Hayata et al., 2001; Sasaki et al., 2001) untersucht, so werden Hinweise auf die Schädigung von Stammzellen im Knochenmark und deren Halbwertszeit erhalten. Diese Daten erleichtern dann eine Dosisabschätzung, wenn ein großer Zeitraum zwischen Strahlenexposition und biologischer Dosimetrie liegt.

In den Fällen in denen keine physikalischen Dosimeter zum Zeitpunkt der Strahlenexposition vorhanden sind oder eine Berechnung der strahlenbiologischen Dosis schwierig und ungenau wäre, kann die biologische Dosimetrie wichtige Hinweise zur Höhe der Strahlendosis liefern. So waren z.B. bei einem Strahlenunfall in Tokai-mura (Japan) am 30 Oktober 1999 mehrere

Personen einer Neutronen- und Gammastrahlenbelastung ausgesetzt. Die im folgenden berechneten Äquivalenzdosen für die drei Strahlenopfer mit der höchsten angenommenen Strahlendosis nach Auswertung von biologischen Indikatoren stimmten mit der angewendeten physikalisch-medizinischen Meßmethode gut überein, wenn für die Berechnung eine RBW von 1,5 bis 2 für Neutronen angenommen wird (Hayata et al., 2001; Ishigure et al., 2001). Bei Personen die aufgrund des Tokai-mura-Unfalls einer geringen Strahlenexposition unterlagen, wurden zunächst deutliche Unterschiede zwischen der biologisch und physikalisch abgeschätzten Strahlendosis sichtbar. Erst nach einer Korrektur der Aberrationsraten in Bezug auf das Alter der exponierten Personen und eine Einteilung der Personen in Gruppen hinsichtlich der Nähe zur Strahlenquelle konnte eine Korrelation in den Personengruppen aber nicht bei den einzelnen Personen festgestellt werden (Sasaki et al., 2001).

5.7. Schlussfolgerung und Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit gesammelten Daten zur Reaktionen von PBLs gesunder Spender auf dünn- und dicht-ionisierende Strahlung geben wichtige Hinweise zur Strahlensensibilität einzelner Spender (Inter-Donor-Effekt) sowie Unterschiede der Strahlenempfindlichkeit in ein und der selben Person (Intra-Donor-Effekt). Es wurde deutlich, dass die Messungen biologischer Parameter zeitlichen Schwankungen unterliegt. Somit sollten die zu untersuchenden Faktoren, wie z.B. die Zellproliferation, die Stimulation und Apoptoserate parallel gemessen werden um den Einfluss von Intra-Donor-Unterschieden zu minimieren. Dies erfordert einen erhöhten Arbeitsaufwand, ist aber für eine gesicherte Aussage des Einflusses der untersuchten Parameter unerlässlich. Die abschließende Auswertung am Mikroskop sollte dann von ein und der selben Person vorgenommen werden, um subjektive Fehler zu minimieren. Auch um Messwerte, wie z.B. die RBW, möglichst genau berechnen zu können, sollte parallel zur Teststrahlung mit Lymphozyten des gleichen Spenders mindestens ein Probenzeitpunkt der Referenzstrahlung angefertigt werden. Dies kann Veränderungen in der Strahlenreaktion der Zellen zu vorangegangenen Experimenten mit der gleichen Referenzstrahlung aufzeigen.

Erste Hinweise auf Unterschiede in der Strahlensensibilität zwischen zwei Blutspendern zeigten sich bei der Untersuchung von Chromosomenaberrationen in Metaphasezellen nach Bestrahlung mit 400MeV/u Kohlenstoffionen (Abbildung 4.1, unten). Weitere Experimente sind nötig um diese Beobachtung zu untermauern. Da auch andere Arbeitsgruppen zu ähnlichen Ergebnissen kommen und ebenfalls Inter-Donor-Unterschiede beschreiben (Übersicht siehe Tabelle 5.4), muss überdacht werden, ob jeweils eine Eichkurve pro Labor zur Abschätzung einer Strahlendosis in der biologischen Dosimetrie ausreicht. Das Erstellen mehrerer Eichkurven und die Einteilung der zu untersuchenden Personen in Gruppen mit annähernd identischer Strahlensensibilität, wird die Genauigkeit einer Dosisabschätzung erhöhen. Hierzu ist jedoch eine *in vitro* Bestrahlung von Zellen der einzelnen Personen nötig um eine Klassifizierung hinsichtlich der Strahlenempfindlichkeit vorzunehmen.

Inwieweit die Auswertung von Chromosomenschäden in Metaphasezellen als „predictive assay“ verwendet werden kann, läßt sich noch nicht sicher beantworten (Überblick in Peters und McKay, 2001). Jedoch zeigen die Untersuchungen von PBLs der Spender 1 und 2 eine annähernd identische Aberrationsrate in zwei voneinander unabhängigen Röntgenexperimenten (Abbildung 4.2), wohingegen die Induktion der Apoptose innerhalb eines Spenders Schwankungen unterworfen war (Kapitel 4.9.2.). Die Abschätzung von Strahlensensibilitäten einzelner Patienten durch eine der Therapie vorangehende *in vitro* Bestrahlung von PBLs ist von großem Interesse für Mediziner und Strahlenbiologen. Hierzu ist eine Untersuchung der betreffenden Personen vor und nach der Strahlentherapie sehr hilfreich, denn die *in vivo* Reaktion von Patienten, die einer ähnlichen Bestrahlungsplanung unterliegen (Dosis, Tumolvolumen, Bestrahlungsfelder, Dauer der Bestrahlung usw.), und die im Vorfeld gesammelten *in vitro* Daten dieser Personen können weitere Erkenntnisse zur individuellen Strahlenempfindlichkeit liefern.

Jedoch gibt es bereits erste Hinweise, dass neben genetischen Prädispositionen auch physiologische Faktoren, wie z.B. die Hormonkonzentration (z.B. Ricoul et al., 1997; Kanda und Hayata, 1999) die Aberrationsrate beeinflussen. Sollten sich diese Anzeichen bestätigen, so müssen sie ebenfalls bei zukünftigen Messungen berücksichtigt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Abend, M., K. Kehe, K. Kehe, M. Riedel, D. Van Beuningen (2000). Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death can be improved by considering other modes of death. *International Journal of Radiation Biology* **76**, 249 – 259.
- Alberts, A., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter (1999). Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- Alpen, E. L. (1998). Radiation Biophysics. Academic Press, San Diego, 4.
- Anderson, R. M., S. J. Marsden, E. G. Wright, M. A. Kadhim, D. T. Goodhead, C. S. Griffin (2000). Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-LET α -particles. *International Journal of Radiation Biology* **76**, 31 – 42.
- Andersson, H. C. (1993). The spontaneous frequency of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in cultured peripheral lymphocytes of a single blood donor sampled more than 200 times. *Mutation Research* **286**, 281 – 292.
- Arbogast, A., S. Boutet, M.-A. Phelouzat, O. Plastre, R. Quadri, J. J. Proust (1999). Failure of T lymphocytes from elderly humans to enter the cell cycle is associated with low cdk6 activity and impaired phosphorylation of Rb protein. *Cellular Immunology* **197**, 46 – 54.
- Aufderheide, E., H. Rink, L. Hieber, G. Kraft (1987). Heavy ion effects on cellular DNA: strand break induction and repair in cultured diploid lens epithelial cells. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine* **51**, 779 – 790.
- Awa, A. A., T. Sofuni, T. Honda, M. Itoh, S. Neriishi, M. Otake (1978). Relationship between the radiation dose and chromosome aberrations in atomic bomb survivors of Hiroshima and Nagasaki. *Journal of Radiation Research* **19**, 126 – 140.
- Awa, A. A., J. V. Neel (1986). Cytogenetic “rogue” cells: what is their frequency, origin and evolutionary significance? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 1021 – 1025.
- Barendsen, G. W., H. M. G. Walter, J. F. Fowler, D. K. Bewley (1963). Effects of different ionizing radiations on human cells in tissue culture: III. Experiments with cyclotron-accelerated alpha-particles and deuterons. *Radiation Research* **18**, 106 – 119.
- Barquinero, J. F., L. Barrios, M. R. Caballin, R. Miro, M. Ribas, J. Egozcue (1997). Biological dosimetry in stimulated in vitro partial irradiations. *International Journal of Radiation Biology* **71**, 435 – 440.
- Barquinero, J. F., S. Cigarrán, M. R. Caballín, H. Braselmann, M. Ribas, J. Egozcue, L. Barrios (1999). Comparison of X-ray dose-response curves obtained by chromosome painting using conventional and PAINT nomenclatures. *International Journal of Radiation Biology* **75**, 1557 – 1566.
- Bauchinger, M., E. Schmid, H. Braselmann (1986). Cell survival and radiation induced chromosome aberrations: II. Experimental findings in human lymphocytes analysed in first and second post-irradiation metaphases. *Radiation and Environmental Biophysics* **25**, 253 – 260.

- Bauchinger, M. (1995). Cytogenetic research after accidental radiation exposure. *Stem Cells* **13**, 182 – 190.
- Bauchinger, M., E. Schmid (1998). LET dependence of yield ratios of radiation-induced intra- and interchromosomal aberrations in human lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology* **74**, 17 – 25.
- Bauchinger, M., E. Schmid, H. Braselmann (2001). Time-course of translocation and dicentric frequencies in a radiation accident case. *International Journal of Radiation Biology* **77**, 553 – 557.
- Bedford, J. S., J. B. Mitchell, H. G. Griggs, M. A. Bender (1978). Radiation-induced cellular reproductive death and chromosome aberration. *Radiation Research* **76**, 573 – 586.
- Belli, M., R. Cherubini, S. Finotto, G. Moschini, O. Saporà, G. Simone, M. A. Tabocchini (1989). RBE-LET relationship for the survival of V79 cells irradiated with low energy protons. *International Journal of Radiation Biology* **55**, 93 – 104.
- Bender, M., P. C. Gooch (1967). Chromosom aberrations in irradiated humans. In: Progress in Radiobiology, Vol. II. L. Turano, A. Ratti, C. Biagini (Hg.), Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 1421 – 1425.
- Beninson, D., D. C. Lloyd, A. T. Natarajan, G. Obe, R. J. Preston, M. S. Sasaki (1986). Biological dosimetry: chromosomal aberration analysis for dose assessment. International Atomic Energy Agency, Technical Report Series 260, Vienna.
- Berger, S. (2001). Untersuchung der Wirkung von Schwerionenstrahlen auf menschliche Hautfibroblasten unter besonderer Berücksichtigung chromosomaler Veränderungen. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Bianchi, M., N. O. Bianchi, J. G. Brewen, K. E. Buckton, L. Fabry, P. Fischer, P. C. Gooch, M. Kucerova, A. Leonard, R. N. Mukherjee, U. Mukherjee, J. Pohl-Rüling, H. G. Schwarzach, D. Scott, T. Sharma, E. Takahashi, C. Tanzarella, P. P. W. van Buul (1982). Evaluation of radiation-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Mutation Research* **96**, 233 – 242.
- Blakely, E. A., F. Q. H. Ngo, P. Y. Chang, L. Lommel, W. Kraft-Weyrather, G. Kraft, C. A. Tobias (1980). Heavy-ion cell-cycle response and progression effects. In: Biological and Medical Research with Accelerated Heavy Ions at the Bevalac. M. C. Pirucello, C. A. Tobias (Hg.). LBL-report 11220, 125 – 135.
- Bloom, A. D., J. V. Neel, K. W. Choi, S. Iida, N. Chagnon (1970). Chromosome aberrations among the Yanomamma Indians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **66**, 920 - 927.
- Bloom, A. D., J. V. Neel, T. Tsuchimoto, K. Meilinger (1973). Chromosomal breakage in leukocytes of south American Indians. *Cytogenetics and Cell Genetics* **12**, 175 – 186.
- Boreham, D. R., K. L. Gale, S. R. Maves, J-A. Walker, D. P. Morrison (1996). Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: potential as a biological dosimeter. *Health Physics* **71**, 685 – 691.
- Campana, D., G. Janossy (1988). Proliferation of normal and malignant human immature lymphoid cells. *Blood* **71**, 1201 – 1210.
- Carloni, M., R. Meschini, L. Ovidi, F. Palitti (2001). PHA-induced cell proliferation rescues human peripheral blood lymphocytes from X-ray-induced apoptosis. *Mutagenesis* **16**, 115 – 120.

- Catena, C., D. Conti, A. Del Nero, E. Righi (1992). Inter-individual differences in radiation response shown by an in vitro micronucleus assay: effects of 3-aminobenzamide on X-ray treatment. *International Journal of Radiation Biology* **62**, 687 – 694.
- Cheng, X., G. E. Pantelias, R. Okayasu, N. Cheong, G. Iliakis (1993). Mitosis-promoting factor activity of inducer mitotic cells may affect radiation yield of interphase chromosome breaks in the premature chromosome condensation assay. *Cancer Research* **53**, 5592 – 5596.
- Coco-Martin, J. M., A. C. Begg (1997). Detection of radiation-induced chromosome aberrations using fluorescence in situ hybridization in drug-induced premature chromosome condensations of tumor cell lines with different radiosensitivities. *International Journal of Radiation Biology* **71**, 265 – 273.
- Crompton, N. E. A., Y.-Q. Shi, G. C. Emery, L. Wisser, H. Blattmann, A. Maier, L. Li, D. Schindler, H. Ozsahin (2001). Sources of variation in patient response to radiation treatment. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **49**, 547 – 554.
- Deaven, L. L., D. F. Petersen (1973). The chromosomes of CHO, an aneuploid Chinese hamster cell line: G-band, C-band and autoradiographic analyses. *Chromosoma* **41**, 129 – 144.
- Dewey, W. C., C. C. Ling, R. E. Meyn (1995). Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **33**, 781 – 796.
- Domracheva, E. V., N. B. Rivkind, E. A. Aseeva, T. N. Obukhova, L.V. D'achenko, A. I. Vorobiov (2000). Stable and unstable aberrations in lymphocytes of Chernobyl accident clearance workers carrying rogue cells. *Applied Radiation and Isotopes* **52**, 1153 – 1159.
- Durante, M., Y. Furusawa, K. George, G. Gialanella, O. Greco, G. Grossi, N. Matsufuji, M. Pugliese, T. C. Yang (1998). Rejoining and misrejoining of radiation-induced chromatin breaks. IV. Charged particles. *Radiation Research* **149**, 446 – 454.
- Durante, M., Y. Furusawa, H. Majima, T. Kawata, E. Gotoh (1999). Association between G₂-phase block and repair of radiation-induced chromosome fragments in human lymphocytes. *Radiation Research* **151**, 670 – 676.
- Durante, M., S. Yamada, K. Ando, Y. Furusawa, T. Kawata, H. Majima, T. Nakano, H. Tsujii (2000). X-rays vs. carbon-ion tumor therapy: cytogenetic damage in lymphocytes. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **47**, 793 – 798.
- Durante, M., S. Bonassi, K. George, F. A. Cucinotta (2001). Risk estimation based on chromosomal aberrations induced by radiation. *Radiation Research* **156**, 662 – 667.
- Edwards, A. A., D. C. Lloyd, R. J. Purrott (1979). Radiation induced chromosome aberrations and Poisson distribution. *Radiation and Environmental Biophysics* **16**, 89 – 100.
- Edwards, A. A., D. C. Lloyd, J. S. Prosser, P. Finnon, J. E. Moquet (1986). Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by 8.7MeV protons and 23.5MeV helium-3 ions. *International Journal of Radiation Biology* **50**, 137 – 145.
- Edwards, A. A. (1997). The use of chromosomal aberrations in human lymphocytes for biological dosimetry. *Radiation Research* **148**, 39 – 44.
- Edwards, A. A. (2001). RBE of radiations in space and the implication for space travel. *Physica Medica* **17**, 147 – 152.

- Enghardt, W., J. Debus, T. Haberer, B. G. Hasch, R. Hinz, O. Jäkel, M. Krämer, K. Lauckner, J. Pawelke (1999). The application of PET to quality assurance of heavy-ion tumor therapy. *Strahlentherapie und Onkologie* **175**, 33 – 36.
- Evans, H. (1974). Effects of ionizing radiation on mammalian chromosomes. In: *Chromosomes and Cancer*. J. German (Hg.), John Wiley & Sons, New York.
- Fabry, L., A. Leonard, A. Wambersie (1985). Induction of chromosome aberrations in G₀ human lymphocytes by low doses of ionizing radiation of different quality. *Radiation Research* **103**, 122 – 134.
- Fabry, L., M. Lemaire (1986). Dose response relationships for radiation induced chromosome aberrations in human lymphocytes in vivo and in vitro. *Strahlentherapie* **162**, 63 – 67.
- Fenech, M., A. A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research* **147**, 29 – 36.
- Fenech, M., A. A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research* **161**, 193 – 198.
- Finnon, P., D. C. Lloyd, A. A. Edwards (1995). Fluorescence in situ hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry. *International Journal of Radiation Biology* **68**, 429 – 435.
- Fournier, C., M. Schlotz, W. K. Weyrather, H. P. Rodemann, G. Kraft (2001). Changes of fibrosis-related parameters after high- and low-LET irradiation of fibroblasts. *International Journal of Radiation Biology* **77**, 713 – 722.
- Fricke, H., E. J. Hart (1966). *Radiation Dosimetry*, Bd. 2. Academic Press, New York.
- Füssel, K. (1997). Chromosomenaberrationen in humanen Fibroblasten nach Bestrahlung mit hochenergetischen Kohlenstoffionen und Röntgenstrahlung. Dissertation, TH Darmstadt.
- Geard, C. R. (1985). Charged particle cytogenetics: effects of LET, fluence and particle separation on chromosome aberrations. *Radiation Research* **104**, 112 – 121.
- George, K., H. Wu, V. Willingham, Y. Furusawa, T. Kawata, F. A. Cucinotta (2001a). High- and low-LET induced chromosome damage in human lymphocytes: a time-course of aberrations in metaphase and interphase. *International Journal of Radiation Biology* **77**, 175 – 183.
- George, K., M. Durante, H. Wu, V. Willingham, G. Badhwar and F.A. Cucinotta (2001b). Chromosome aberrations in the blood lymphocytes of astronauts after space flight. *Radiation Research* **156**, 731 – 738.
- Gerasimenko, V. N., R. D. Govorun, N. I. Ryzhov (1980). [Effect of accelerated boron, carbon, and neon ions on human lymphocyte chromosomes in vitro] Veröffentlichung in russisch. *Radiobiologiya* **20**, 206 – 211.
- Gerdes, J., U. Schwab, H. Lemke, H. Stein (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer* **31**, 13 – 20.
- Gerdes, J., H. Lemke, H. Baisch, H. H. Wacker, U. Schwab, H. Stein (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67. *Journal of Immunology* **133**, 1710 – 1715.

- Gerdes, J., L. Li, C. Schlueter, M. Duchrow, C. Wohlenberg, C. Gerlach, I Stahmer, S. Kloth, E. Brandt, H.-D. Flad (1991). Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *American Journal of Pathology* **138**, 867 – 873.
- Gillespie, C. J., J. D. Chapman, A. P. Reuvers, D. L. Dugle (1975). The inactivation of Chinese hamster cells by X-rays: synchronized and exponential cell populations. *Radiation Research* **64**, 353 – 364.
- Gooch, P. C., M. A. Bender, M. L. Randolph (1964). Chromosome aberrations induced in human somatic cells by neutrons. In: Biological Effects of Neutron and Proton Irradiation, Vol. I. International Atomic Energy Agency, Vienna, 325 – 342.
- Goodhead, D. T. (1989). The initial physical damage produced by ionizing radiations. *International Journal of Radiation Biology* **56**, 623 – 634.
- Goodwin, E. H., E. A. Blakely, C. A. Tobias (1994). Chromosomal damage and repair in G₁-phase Chinese hamster ovary cells exposed to charged-particle beams. *Radiation Research* **138**, 343 – 351.
- Gotoh, E., Y. Asakawa, H. Kosaka (1995). Inhibition of protein serine/threonine phosphatases directly induces premature chromosome condensation in mammalian somatic cells. *Biomedical Research* **16**, 63 – 68.
- Gray, J. W., D. Pinkel, J. M. Brown (1994). Review: fluorescence in situ hybridization in cancer and radiation biology. *Radiation Research* **137**, 275 – 289.
- Greinert, R., E. Detzler, B. Volkmer and D. Harder (1995). Kinetics of the formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes: analysis by premature chromosome condensation with delayed fusion. *Radiation Research* **144**, 190 – 197.
- Größer, T. (1998). Untersuchungen strahleninduzierter Chromosomenaberrationen mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt.
- Guerrero-Carbajal, Y. C., J. E. Moquet, A. A. Edwards, D. C. Lloyd (1998). The persistence of FISH translocations for retrospective biological dosimetry after simulated whole or partial body irradiation. *Radiation Protection Dosimetry* **76**, 159 – 168.
- Haberer, T., W. Becher, D. Scharadt, G. Kraft (1993). Magnetic scanning system for heavy ion therapy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A* **330**, 296 – 305.
- Han, T., B. Dadey (1978). T-lymphocyte dependency of B-lymphocyte blastogenic response to phytomitogens. *Immunology* **34**, 625 – 629.
- Hayata, I., R. Kanda, M. Minamihisamatsu, A. Furukawa, M. S. Sasaki (2001). Cytogenetical dose estimation for 3 severely exposed patients in the JCO criticality accident in Tokaimura. *Journal of Radiation Research* **42**, 149 – 155.
- Heeg, P., G. Hartmann, O. Jäkel, C. Karger, G. Kraft (1999). Quality assurance at the heavy-ion therapy facility at GSI. *Strahlentherapie und Onkologie* **175**, 36 – 38.
- Heilmann, J., G. Taucher-Scholz, G. Kraft (1995). Induction of DNA double-strand breaks in CHO-K1 cells by carbon ions. *International Journal of Radiation Biology* **68**, 153 – 162.
- Heilmann, J., G. Taucher-Scholz, T. Haberer, M. Scholz, G. Kraft (1996). Measurement of intracellular DNA double-strand break induction and rejoining along the track of carbon and neon particle beams in water. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **34**, 599 – 608.

- Hertveldt, K., J. Philippé, H. Thierens, M. Cornelissen, A. Vral, L. De Ridder (1997). Technical Report: flow cytometry as a quantitative and sensitive method to evaluate low dose radiation induced apoptosis in vitro in human peripheral blood lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology* **71**, 429 – 433.
- Huber, R., H. Braselmann, M. Bauchinger (1992). Intra- and inter-individual variation of background and radiation-induced micronucleus frequencies in human lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology* **61**, 655 – 661.
- Huber, R., H. Braselmann, U. Kulka, V. Schumacher-Georgiadou, A. Bayerl, M. Molls, M. Bauchinger (1999). Follow-up analysis of translocation and dicentric frequencies, measured by FISH-chromosome painting in breast cancer patients after partial-body radiotherapy with little bone marrow exposure. *Mutation Research* **446**, 103 – 109.
- Hungerford, D. A., A. J. Donnelly, P. C. Nowell, S. Beck (1959). The chromosome constitution of human phenotypic intersex. *The American Journal of Human Genetics* **11**, 215 – 236.
- ISCN (1978). An international system for human cytogenetic nomenclature. *Cytogenetics and Cell Genetics* **21**, 309 – 404.
- Ishigure, N., A. Endo, Y. Yamaguchi, K. Kawachi (2001). Calculation of the absorbed dose for the overexposed patients at the JCO critically accident in Tokai-mura. *Journal of Radiation Research* **42**, 137 – 148.
- Jaworska, A., I. Szumiel, P. de Angelis, G. Olsen, J. Reitan (2001). Evaluation of ionizing radiation sensitivity markers in a panel of lymphoid cell lines. *International Journal of Radiation Biology* **77**, 269 – 280.
- Johnson, R. T., P. N. Rao (1970). Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* **226**, 94 – 103.
- Jordan, R., J. Edington, H. H. Evans, J. J. Schwartz (1999). Detection of chromosome aberrations by FISH as a function of cell division cycle (Harlequin-FISH). *BioTechniques* **26**, 532 – 534.
- Kakati, S., J. R. Kowalczyk, Z. Gibas, A. A. Sandberg (1986). Use of radiation induced chromosomal damage in human lymphocytes as a biological dosimeter is questionable. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **22**, 137 – 141.
- Kanda, R., I. Hayata (1999). Effect of estradiol on radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes. *Journal of Radiation Research* **40**, 95 – 100.
- Kern, P., L. Keilholz, C. Forster, M.-H. Seegenschmiedt, R. Sauer, M. Herrmann (1999). In vitro apoptosis in peripheral blood mononuclear cells induced by low-dose radiotherapy displays a discontinuous dose-dependence. *International Journal of Radiation Biology* **75**, 995 – 1003.
- Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie, A. R. Currie (1972). Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* **26**, 239 – 257.
- Kiefer, J. (1989). Biologische Strahlenwirkung. Birkenhäuser Verlag, Basel, 1 – 15.
- Kolin-Gerresheim, J., M. Bauchinger (1981). Dependence of the frequency of harlequin-stained cells on BrdU concentration in human lymphocyte cultures. *Mutation Research* **91**, 251 – 254.
- Krämer, M., G. Kraft (1994). Track structure and DNA damage. *Advances in Space Research* **14**, 151 – 159.

- Krämer, M., M. Scholz (2000). Treatment planning for heavy-ion radiotherapy: calculation and optimization of biologically effective dose. *Physics in Medicine and Biology* **45**, 3319 – 3330.
- Kraft, G. (1990). The radiobiological and physical basis for radiotherapy with protons and heavier ions. *Strahlentherapie und Onkologie* **166**, 10 – 13.
- Kraft, G., M. Scholz, U. Bechthold (1999). Tumor therapy and track structure. *Radiation and Environmental Biophysics* **38**, 229 – 237.
- Kraft, G. (2000). Tumor Therapy with heavy charged particles. *Progress in Particle and Nuclear Physics* **45**, 473 – 544.
- Lazutka, J. R. (1996). Chromosome aberrations and rogue cells in lymphocytes of Chernobyl clean-up workers. *Mutation Research* **350**, 315 – 329.
- Lindholm, C., S. Salomaa, M. Tekkel, W. Paile, A. Koivistoinen, T. Ilus, T. Veidebaum (1996). Biodosimetry after accidental radiation exposure by conventional chromosome analysis and FISH. *International Journal of Radiation Biology* **70**, 647 – 656.
- Lindholm, C., S. Luomahaara, A. Koivistoinen, T. Ilus, A.A. Edwards, S. Salomaa (1998). Comparison of dose-response curves for chromosomal aberrations established by chromosome painting and conventional analysis. *International Journal of Radiation Biology* **74**, 27 – 34.
- Lloyd, D. C., R. J. Purrott, G. W. Dolphin, Dawn Bolton, A. A. Edwards (1975). The relationship between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology* **28**, 75 – 90.
- Lloyd, D. C., G. W. Dolphin, R. J. Purrott, P.A. Tipper (1977). The effect of X-ray induced mitotic delay on chromosome aberration yields in human lymphocytes. *Mutation Research* **42**, 401 – 412.
- Lloyd, D. C., R. J. Purrott (1981). Chromosome aberration analysis in radiological protection dosimetry. *Radiation Protection Dosimetry* **1**, 19 – 28.
- Lloyd, D. C., A. A. Edwards, A. Leonard, G. Deknudt, A. Natarajan, G. Obe, F. Palitti, C. Tanzarella, E. J. Tawn (1988). Frequencies of chromosomal aberrations induced in human blood lymphocytes by low doses of X-rays. *International Journal of Radiation Biology* **53**, 49 – 55.
- Lloyd, D. C., A. A. Edwards, A. Leonard, G. L. Deknudt, L. Verschaeve, A. T. Natarajan, F. Darroudi, G. Obe, F. Palitti, C. Tanzarella, E. J. Tawn (1992). Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced in vitro by very low doses of X-ray. *International Journal of Radiation Biology* **61**, 335 – 343.
- Lloyd, D. C., J. N. Lucas, A. A. Edwards, W. Deng, E. Valente, P. A. Hone, J. E. Moquet (2001). A study to verify a reported excess of chromosomal aberrations in blood lymphocytes of namibian uranium miners. *Radiation Research* **155**, 809 – 817.
- Lopez, F., F. Belloc, F. Lacombe, P. Dumain, J. Reiffers, P. Bernard, M. R. Boisseau (1991). Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry* **12**, 42 – 49.
- Louagie, H., M. Cornelissen, J. Philippe, A. Vral, H. Thierens, L. De Ridder (1998a). Flow cytometric scoring of apoptosis compared to electron microscopy in γ irradiated lymphocytes. *Cell Biology International* **22**, 277 – 283.
- Louagie, H., J. Philippe, A. Vral, M. Cornelissen, H. Thierens, L. De Ridder (1998b). Induction of micronuclei and apoptosis in natural killer cells compared to T

- lymphocytes after γ -irradiation. *International Journal of Radiation Biology* **73**, 179 – 185.
- Meijer, A. E., U.-S. E. Kronqvist, R. Lewensohn, M. Harms-Ringdahl (1998). RBE for the induction of apoptosis in peripheral lymphocytes exposed in vitro to high-LET radiation generated by accelerated nitrogen ions. *International Journal of Radiation Biology* **73**, 169 – 177.
- Meijer, A. E., A. B. Bäckbro Saeidi, A. Zelenskaya, S. Czene, F. Granath, M. Harms-Ringdahl (1999). Influence of dose-rate, post-irradiation incubation time and growth factors on interphase cell death by apoptosis and clonogenic survival of human peripheral lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology* **75**, 1265 – 1273.
- Menz, R., R. Andres, B. Larsson, M. Ozsahin, K. Trott, N. E. A. Crompton (1997). Biological dosimetry: the potential use of radiation-induced apoptosis in human T-lymphocytes. *Radiation and Environmental Biophysics* **36**, 175 – 181.
- Mitchell, J. C., A. Norman (1987). A induction of micronuclei in human lymphocytes by low doses of radiation. *International Journal of Radiation Biology* **52**, 527 – 535.
- Morris, S. M. (1991). The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine in mammalian cells. *Mutation Research* **258**, 161 – 188.
- Müller, W.-U., C. Streffer (1991). Biological indicators for radiation damage. *International Journal of Radiation Biology* **59**, 863 – 873.
- Mustonen, R., C. Lindholm, E. J. Tawn, L. Sabatiers, S. Salomaa (1998). The incidence of cytogenetically abnormal rogue cells in peripheral blood. *International Journal of Radiation Biology* **74**, 781 – 785.
- Nakano, M., Y. Kodama, K. Ohtaki, M. Itoh, R. Delongchamp, A. A. Awa, N. Nakamura (2001). Detection of stable chromosome aberrations by FISH in A-bomb survivors: comparison with previous solid Giemsa staining data on the same 230 individuals. *International Journal of Radiation Biology* **77**, 971 – 977.
- Nasonova, E., S. Ritter, T. Fomenkova, G. Kraft (1998). Induction of chromosomal damage in CHO-K1 cells and their repair-deficient mutant xrs5 by X-ray and particle irradiation. *Advances in Space Research* **22**, 569 – 578.
- Nasonova, E., S. Ritter, E. Gudowska-Nowak, G. Kraft (2001). High-LET-induced chromosomal damage: time-dependent expression. *Physica Medica* **17**, 198 – 201.
- Neel, J. V., E. O. Major, A. A. Awa, T. Glover, A. Burgess, R. Traub, B. Curfman, C. Satoh (1996). Hypothesis: “rogue cell”-type chromosomal damage in lymphocytes is associated with infection with the JC human polyoma virus and has implications for oncogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 2690 – 2695.
- Neel, J. V. (1998). An association, in adult Japanese, between the occurrence of rogue cells among cultured lymphocytes (JC virus activity) and the frequency of “simple” chromosomal damage among the lymphocytes of persons exhibiting these rogue cells. *American Journal of Human Genetics* **63**, 489 – 497.
- Obe, G., I. Johannes, C. Johannes, K. Hallman, G. Rietz and R. Facius (1997). Chromosomal aberrations in blood lymphocytes of astronauts after long-term space flights. *International Journal of Radiation Biology* **72**, 727 – 734.
- Ohara, H., N. Okazaki, M. Monobe, S. Watanabe, M. Kanayama, M. Minamihisamatsu (1998). Induction of asymmetrical type of chromosomal aberrations in cultured human

- lymphocytes by ion beams of different energies at varying LET from HIMAC and RRC. *Advances in Space Research* **22**, 1673 – 1682.
- Okayasu, R., G. Iliakis (1993). Ionizing radiation induces two forms of interphase chromosome breaks in chinese hamster ovary cells that rejoin with different kinetics and show different sensitivity to treatment in hypertonic medium or β -araA. *Radiation Research* **136**, 262 – 270.
- Pala, F. S., J. E. Moquet, A. A. Edwards, D. C. Lloyd (2001). In vitro transmission of chromosomal aberrations through mitosis in human lymphocytes. *Mutation Research* **474**, 139 – 146.
- Pantelias, G. E., H. D. Maillie (1983). A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using Polyethylene Glycol. *Somatic Cell Genetics* **9**, 533 – 547.
- Pantelias, G. E., H. D. Maillie (1984). The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry. *Radiation Research* **99**, 140 – 150.
- Pantelias, G. E., H. D. Maillie (1985). Direct analysis of radiation-induced chromosome fragments and rings in unstimulated human peripheral blood lymphocytes by means of the Premature Chromosome Condensation technique. *Mutation Research* **149**, 67 – 72.
- Perry, P., S. Wolff (1974). New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* **251**, 156 – 158.
- Peters, L., M. McKay (2001). Predictive assays: will they ever have a role in the clinic? *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **49**, 501 – 504.
- Pinkel, D., T. Straume, J. W. Gray (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridisation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 2934 – 2938.
- Poncelet, E., A. Leonard, E. D. Leonard, B. Dutrillaux (1988). Biological dosimetry: radiation-induced mitotic delay can lead to underestimate of the part of body exposed after non-uniform irradiation. *Strahlentherapie und Onkologie* **164**, 542 – 543.
- Prasanna, P. G. S., N. D. Escalada, W. F. Blakely (2000). Induction of premature chromosome condensation by a phosphatase inhibitor and a protein kinase in unstimulated human peripheral blood lymphocytes: a simple and rapid technique to study chromosome aberrations using specific whole-chromosome DNA hybridization probes for biological dosimetry. *Mutation Research* **466**, 131 – 141.
- Prosser, J. S., J. E. Moquet, D. C. Lloyd, A. A. Edwards (1988). Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Research* **199**, 37 – 45.
- Purrott, R. J., N. Vulpis, D. C. Lloyd (1980). The use of harlequin staining to measure delay in the human lymphocyte cell cycle induced by in vitro X-irradiation. *Mutation Research* **69**, 275 – 282.
- Rabbitts, T. H. (1994). Chromosomal translocation in human cancers. *Nature* **372**, 143 – 149.
- Raju, M. R., T. S. Johnson, N. Tokita, S. Carpenter, J. H. Jett (1980). Differences in cell-cycle progression delays after exposure to ^{238}Pu α particles compared to X-rays. *Radiation Research* **84**, 16 – 24.
- Rao, N. P., P. S. Sunkara, D. A. Wright (1981). Chromosome condensation factors of mammalian cells. In: Genes, Chromosomes and Neoplasia. F. E. Arrighi, P. N. Rao and E. Stubblefield (Hg.). Raven Press, New York.

- Ricoul, M., L. Sabatier, B. Duttrillaux (1997). Increased chromosome radiosensitivity during pregnancy. *Mutation Research* **374**, 73 – 78.
- Ritter, S., W. Kraft-Weyrather, M. Scholz, G. Kraft (1990). Influence of radiation quality on heavy ion induced chromosome aberrations in V79 cells. *Radiation Protection Dosimetry* **31**, 257 – 260.
- Ritter, S., W. Kraft-Weyrather, M. Scholz, G. Kraft (1992). Induction of chromosome aberrations in mammalian cells after heavy ion exposure. *Advances in Space Research* **12**, 119 – 125.
- Ritter, S., E. Nasonova, W. Kraft-Weyrather, G. Kraft (1996). Comparison of chromosomal damage induced by X-rays and Ar ions with an LET of 1840keV/ μm in G₁-phase V79 cells. *International Journal of Radiation Biology* **69**, 155 – 166.
- Sasaki, M. S., A. Norman (1967). Selection against chromosome aberrations in human lymphocytes. *Nature* **214**, 502 – 503.
- Sasaki, M. S., I. Hayata, N. Kamada, Y. Kodama, S. Kodama (2001). Chromosome aberration analysis in person exposed to low-level radiation from the JCO criticality accident in Tokai-mura. *Journal of Radiation Research* **42**, 107 – 116.
- Savage, J. (1975). Classification and relationship of induced chromosomal structural changes. *Journal of Medical Genetics* **12**, 103 – 122.
- Schmid, E., M. Bauchinger, S. Streng, U. Nahrstedt (1984). The effect of 220 kVp X-ray with different spectra on the dose response of chromosome aberrations in human lymphocytes. *Radiation and Environmental Biophysics* **23**, 305 – 309.
- Schmid, E., H. Roos, G. Rimpl, M. Bauchinger (1997). Chromosome aberration frequencies in human lymphocytes irradiated in a multi-layer array by protons with different LET. *International Journal of Radiation Biology* **72**, 661 – 665.
- Scholz, M., (1992). Zellzyklusverzögerungen synchroner Zellpopulationen nach Schwerionenbestrahlung. Dissertation, Universität Heidelberg.
- Scholz, M., W. Kraft-Weyrather, S. Ritter, G. Kraft (1994). Cell cycle delays induced by heavy ion irradiation of synchronous mammalian cells. *International Journal of Radiation Biology* **66**, 59 – 75.
- Scholz, M., S. Ritter, G. Kraft (1998). Analysis of chromosome damage based on time course of aberrations. *International Journal of Radiation Biology* **74**, 325 – 331.
- Schulz-Ertner, D., C. Thilmann, M. Wannemacher, J. Debus (2002). Patient irradiations at GSI. In: GSI Scientific Report 2001, 178.
- Schwab, T. (1991). Transport von Schwerionen durch Materie innerhalb ionenoptischer Systeme. Dissertation, Universität Gießen.
- Schwartz, J. L., M. E. Gaulden (1980). The relative contributions of B and T lymphocytes in the human peripheral blood mutagen test system as determined by cell survival, mitogenic stimulation, and induction of chromosome aberrations by radiation. *Environmental Mutagenesis* **2**, 473 – 485.
- Scott, D., C. Y. Lyons (1979). Homogeneous sensitivity of human peripheral blood lymphocytes to radiation-induced chromosome damage. *Nature* **278**, 756 – 758.
- Sevan`kaev, A. V., A. F. Tsyb, D. C. Lloyd, A. A. Zhloba, V. V. Moiseenko, A. M. Skrjabin, V. M. Klimov (1993). “Rogue” cells observed in children exposed to radiation from the Chernobyl accident. *International Journal of Radiation Biology* **63**, 361 – 367.

- Sharpe, H. B. A., D. Scott, G. W. Dolphin (1969). Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by X-irradiation in vitro: the effect of culture techniques and blood donors on aberration yield. *Mutation Research* **7**, 453 – 461.
- Shounan, Y., X. Feng, P. J. O'Connell (1998). Apoptosis detection by Annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* **217**, 61 – 70.
- Sipi, P., C. Lindholm, S. Salomaa (2000). Kinetics of formation of exchanges and rejoining of breaks in human G₀ and G₂ lymphocytes after low-LET radiation. *International Journal of Radiation Biology* **76**, 823 – 830.
- Sisterson, J. (2001). Particles: a newsletter for those interested in proton, light ion and heavy charged particle radiotherapy. <http://neurosurgery.mgh.harvard.edu/hcl/ptles.htm>
- Skarsgard, L. D. (1998). Radiobiology with heavy charged particles: a historical review. *Physica Medica* **14**, 1 – 19.
- Stewart, C. C., A. P. Stevenson, R. C. Habbersett (1988). The effect of low-dose irradiation on unstimulated and PHA-stimulated human lymphocytes subsets. *International Journal of Radiation Biology* **53**, 77 – 87.
- Stronati, L., M. Durante, G. Gensabella, G. Gialanella, G. F. Grossi, M. Pugliese, P. Scampoli, A. Sgura, A. Testa, C. Tanzarella (2001). Calibration curves for biological dosimetry by fluorescence in situ hybridisation. *Radiation Protection Dosimetry* **94**, 335 – 345.
- Takatsuji, T., M. S. Sasaki (1984). Dose-effect relationship of chromosome aberrations induced by 23MeV alpha particles in human lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology* **45**, 237 – 243.
- Tawn, E. J., C. L. Cartmel, E. M. T. Pyta (1985). Cells with multiple chromosome aberrations in control individuals. *Mutation Research* **144**, 247 – 250.
- Testard, I., M. Ricoul, F. Hoffschir, A. Flury-Herard, B. Dutrillaux, B. Fedorenko, V. Gerasimenko, L. Sabatier (1996). Radiation-induced chromosome damage in astronauts' lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology* **70**, 403 – 411.
- Testard, I., B. Dutrillaux, L. Sabattier (1997). Chromosomal aberrations induced in human lymphocytes by high-LET irradiation. *International Journal of Radiation Biology* **72**, 423 – 433.
- Testard, I., L. Sabatier (1999). Biological dosimetry for astronauts: a real challenge. *Mutation Research* **430**, 315 – 326.
- Tobias, C. A., E. A. Alpen, E. A. Blakely, J. R. Castro, A. Chatterjee, G. T. Y. Chen, S. B. Curtis, J. Howard, J. T. Lyman, F. Q. H. Ngo (1979). Radiobiological basis for heavy-ion therapy. In: Treatment of Radioresistant Cancers. M. Abe, K. Sakamoto, T. L. Phillips (Hg.), Elsevier Biomedical Press, North-Holland, 159 – 183.
- Van Buul, P. P. W., A. T. Natarajan (1980). Chromosomal radiosensitivity of human leucocytes in relation to sampling time. *Mutation Research* **70**, 61 – 69.
- Verheijen, R., H. J. H. Kuijpers, R. O. Schlingemann, A. L. M. Boehmer, R. van Driel, G. J. Brakenhoff, F. C. S. Ramaekers (1989a). Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen: I. Intracellular localization during interphase. *Journal of Cell Science* **92**, 123 – 130.
- Verheijen, R., H. J. H. Kuijpers, R. van Driel, J. L. M. Beck, J. H. van Dierendonck, G. J. Brakenhoff, F. C. S. Ramaekers (1989b). Ki-67 detects a nuclear matrix-associated

- proliferation-related antigen: II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *Journal of Cell Science* **92**, 531 – 540.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, C. Reutelingsperger (1995). A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* **184**, 39 – 51.
- Virsik-Peuckert, P., M. Rave-Fränk, U. Langebrake, H. Schmidberger (1997). Differences in the yields of dicentric and reciprocal translocations observed in the chromosomes of irradiated human skin fibroblasts and blood lymphocytes from the same healthy individuals. *Radiation Research* **148**, 209 – 215.
- Vorobtsova, I., F. Darroudi, A. Semyonov, A. Kanayeva, N. Timofeyeva, T. Yakovleva, G. Zharinov, A. T. Natarajan (2001). Analysis of chromosome aberrations by FISH and Giemsa assays in lymphocytes of cancer patients undergoing whole-body irradiation: comparison of in vivo and in vitro irradiation. *International Journal of Radiation Biology* **77**, 1123 – 1131.
- Ward, J. F. (1985). Biochemistry of DNA lesions. *Radiation Research* **104**, 103 – 111.
- Wells, W. A. E. (1996). The spindle assembly checkpoint: aiming for a perfect mitosis, every time. *Cell Biology* **6**, 228 – 234.
- Weyrather, W. K., S. Ritter, M. Scholz, G. Kraft 1999. RBE for carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity. *International Journal of Radiation Biology* **75**, 1357 – 1364.
- Wojcik, A., C. Streffer (1998). Comparison of radiation-induced aberration frequencies in chromosomes 1 and 2 of two human donors. *International Journal of Radiation Biology* **74**, 573 – 581.
- Wolff, S. (1991). Biological dosimetry with cytogenetic endpoints. *Progress in Clinical and Biological Research* **372**, 351 – 362.
- Wu, H., M. Durante, K. George, T. C. Yang (1997). Induction of chromosome aberrations in human cells by charged particles. *Radiation Research* **148**, 102 – 107.
- Wu, H., K. George, V. Willingham, F. A. Cucinotta (2001). Comparison of chromosome aberration frequencies in pre- and post-flight astronaut lymphocytes irradiated in vitro with gamma rays. *Physica Medica* **17**, 229 – 231.
- Wulf, H., W. Kraft-Weyrather, H. G. Miltenburger, E. A. Blakely, C. A. Tobias, G. Kraft (1985). Heavy-Ion effects on mammalian cells: inactivation measurements with different cell lines. *Radiation Research* **104**, 122 – 134.
- Yang, T. C., K. George, A. S. Johnson, M. Durante and B. S. Fedorenko (1997). Biodosimetry results from space flight Mir-18. *Radiation Research* **148**, 17 – 23.
- Zaider, M. (1996). The combined effects of sublethal damage repair, cellular repopulation and redistribution in the mitotic cycle. II. The dependency of radiosensitivity parameters α , β and t_0 on biological age for chinese hamster V79 cells. *Radiation Research* **145**, 467 – 473.
- Zaire, R., M. Notter, W. Riedel, E. Thiel (1997). Unexpected rates of chromosomal instabilities and alterations of hormone levels in namibian uranium miners. *Radiation Research* **147**, 579 – 584.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Aberrat.	Aberrationen
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline-sulfonate (6)]
ace	Summe aller azentrischen Fragmente, d.h. Chromosomentypbrüche („acentric fragments“)
ar	azentrischer Ring („acentric ring“)
ausgew.	ausgewertete
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	„bovine serum albumin“ (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCD	„charge coupled device“
CDD	„cell death detection“
CHO-K1	Ovarzellen des chinesischen Hamsters („chinese hamster ovary“)
CPT	„cell preparation tube“
csb	Chromosomenbrüche („chromosome breaks“)
ctb	Chromatidbrüche („chromatid breaks“)
cte	Chromatidaustauschaberrationen („chromatid-typ exchanges“)
D	Strahlendosis
Dapi	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Deoxycytidin
dic	dizentrische Chromosomen („dicentric“)
dmin	interstitielle Deletionen und azentrische Ringe („double minutes“)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSBs	Doppelstrangbrüche („double-strand breaks“)
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
ELISA	„enzyme-linked-immuno-adsorbance-assay“
FCS _F	fötales Kälberserum verwendet für Lymphozyten
FCS _H	fötales Kälberserum verwendet für CHO-K1-Zellen
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat

FPG	Fluoreszenz plus Giemsa
g	Einheit der Erdanziehungskraft „gravities“
G	Lücke („gap“)
GSI	Gesellschaft für Schwerionenforschung
Gy	Gray [J/kg]
h	Stunden („hour“)
HBC	Hepatitis C
HBV	Hepatitis B
HIV	„human immuno-deficiency virus“, humaner Immundefizientvirus
ID	Initialschaden („initial damage“)
idel	interstitielle Deletion („interstitial deletions“)
inch	Zoll (2,54cm)
ins	Insertionen („insertions“)
inv	Inversionen („inversions“)
ISCN	„international system for human cytogenetic nomenclature“
KCl	Kaliumchlorid
keV	Kiloelektronenvolt
LET	linearer Energietransfer [keV/ μm]
m	männlich
M	Mitose
MI	Mitoseindex [%]
MilliQ	hochreines Wasser
min	Minuten
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
mol	Mol
MPF	Mitose fördernder Faktor („mitosis-promoting factor“)
MTA	Medizinisch Technische Assistentin
MTP	Mikrotiterplatte
n.b.	nicht bestimmt
n.u.	nicht untersucht
OD	optische Dichte
pA	pro analysis
PBLs	periphere Blutlymphozyten
PBS	„phosphate-buffered saline“

PBT	„phosphate-buffered with Tween“
PCC	„premature chromosome condensation“
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PHA	Phythämagglutinin
PJ	Propidiumjodid
POD	Peroxidase
PS	Phosphatidylserin
r	zentrische Ringe („centric ring“)
R	Reparatur („repair“)
RBW	relative biologische Wirksamkeit
S	Synthese
SCEs	Schwesterchromatidaustausche („sister chromatid exchanges“)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIS	Schwer-Ionen-Synchrotron
SSC	Natriumchlorid –Natriumcitrat-Puffer („saline-sodium citrate“)
Sp.	Spender von Blut
t	Translokationen („translocations“)
T1	humane Nierenzellen
tri	trizentrisches Chromosom („tricentric“)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V79	Hamsterzellen aus der Lunge
w	weiblich
xrs5	chemisch induzierte Mutanten von CHO-K1-Zellen („x-ray sensitiv“)
z.B.	zum Beispiel

7.2. Verwendete Materialien

7.2.1. Chemikalien

Bisbenzimid Hoechst Nr.: 33258 (PAN, Aidenbach)

BSA: Rinderserumalbumin (Sigma, Deisenhofen)

5-Brom-2'-desoxyuridin BrdU (Serva, Heidelberg und Boehringer, Mannheim)

Casy-clean: Kapillar- und Systemreiniger (Schärfe System, Reutlingen)

Casyton: isotone Salzlösung zur Zellzahlbestimmung für Casy 1 (Schärfe System, Reutlingen)

Colcemid: 10µg/ml (Boehringer, Mannheim)

4', 6-Diamino-2-phenylindol Dapi (Serva, Heidelberg)

Eukitt (O. Kindler, Freiburg)

FCS_F fötales Rinderserum verwendet für Lymphozyten – Spezialanfertigung für humane Fibroblasten (Pan, Aidenbach)

FCS_H für CHO-K1-Zellen (Biochrom, Berlin)

Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt)

HAM'S F-12: Zellkulturmedium für CHO-K1-Zellen (PAN, Aidenbach)

L-Glutamin 200mM (PAN, Aidenbach)

Natrium-Heparin: Liquemin N 25000; 5000U/ml (Roche, Mannheim)

Neomycin/Bacitracin: Antibiotikum 1mg/ml bzw. 50U/ml (Biochrom, Berlin)

PBS sterile Lösung ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (PAN, Aidenbach oder Biochrom, Berlin)

PBS sterile Lösung mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (PAN, Aidenbach)

PBS Pulver ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (Sigma, Deisenhofen)

Phythämagglutinin „M-form“ (Gibco, Karlsruhe)

RPMI 1640: Zellkulturmedium für humane Blutlymphozyten (Gibco, Karlsruhe)

Tween 20 (Serva, Heidelberg)

7.2.2. Puffer und Lösungen

Bestrahlungspuffer (FPG-Färbung)	19,45ml	0,2M Dinatriumhydrogenphosphat
	0,55ml	0,1M Zitronensäure
DAPI-Lösung	1mg/ml	Stammlösung in PBS
Fixativ (Chromosomenpräparation)	3 Teile	Methanol pA
	1 Teil	Eisessig pA
Fixativ (Anti-BrdU-Test)	70%	Ethanol pA
	20%	MilliQ
	10%	500mM Glycin-Lösung
Giemsa-Färbelösung	6%	Giemsa in Sörensenpuffer
Hoechst-Färbelösung	4 Teile	PBS (w/o)
	1 Teil	Ethanol pA
	3µg/ml	Hoechst Nr.: 33258
PBT (Anti-Ki67-Test)		PBS (w/o)
	1%	Tween20
	0,1%	BSA
Sörensenpuffer	1 Teil	0,067M Kaliumdihydrogenphosphat
	1 Teil	0,067M Dinatriumhydrogenphosphat
Waschpuffer (Anti-BrdU-Test)		PBS (w/o)
	0,02%	Tween20
	0,002%	BSA
20x SSC	175,3g	Natriumchlorid (= 3M)
	88,4g	Natriumcitrat x 2H ₂ O (= 0,3M)
	ad 1000ml	MilliQ

7.2.3. Medien für die Zellkultur

Für die peripheren Blutlymphozyten wurden die Medien I und II verwendet. Medium I wurde bei der Bestrahlung der Zellen benötigt und für die Kultivierung der PCC-Präparate eingesetzt, da hier keine Stimulierung der Zellen nötig war. Medium II wurde zur Kultivierung der Zellen für die Chromosomenpräparate, Apoptosemessung und Bestimmung des Anteils stimulierter Zellen (Ki67-Test) verwendet.

Im Medium III wurden die CHO-K1-Zellen kultiviert und das Einfriermedium wurde sowohl für die Langzeitlagerung der CHO-K1-Zellen in flüssigem Stickstoff (-196°C) verwendet als auch für die Lagerung der CHO-K1-Mitosen bei -80°C.

Medium I:	RPMI 1640-Medium
	+ 20% FCS _F
	+ 1% L-Glutamin
	+ 1% Neomycin/Bacitracin
	+ 0,2% Natrium-Heparin

Medium II:	RPMI 1640-Medium
	+ 20% FCS _F
	+ 1% L-Glutamin
	+ 1% Neomycin/Bacitracin
	+ 0,2% Natrium-Heparin
	+ 1% PHA
	+ 6µg/ml BrdU
	+ 4,8µg/ml DC

Medium III:	HAM'S F-12
	+ 10% FCS _H
	+ 1% L-Glutamin
	+ 1% Neomycin/Bacitracin

Einfriermedium	HAM'S F-12
	+ 20% FCS _H
	+ 1% L-Glutamin
	+ 1% Neomycin/Bacitracin
	+ 8% DMSO
	+ 5µl/ml Colcemid

7.2.4. Verwendete Tests

- Im Anti-Ki67-Test (Ki-S5) von Boehringer (Mannheim) sind folgende Antikörper enthalten:
 1. „Anti-Ki67 (Ki-S5) formalin grade“ aus der Maus
 2. „Anti-mouse-Ig-Rhodamin F(ab)₂ fragment“ aus dem Schaf
- Im „5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I“ (Anti-BrdU-Test) von Roche sind folgende Antikörper enthalten:
 1. „Anti-BrdU with nucleases“ aus der Maus
 2. „Anti-mouse-Ig-fluorescein“ aus dem Schaf
- „ApopNexinTM Apoptosis Detection Kit“ von Oncor
- „Cell Death Detection ELISA^{Plus}“ von Roche

7.2.5. Einwegmaterial

Blutentnahme-Set „Blood Collection Set“ (Becton Dickinson, Heidelberg)

Casy-cups: Behälter für die Zellzahlbestimmung mit Casy 1 (Schärfe System, Reutlingen)

Deckgläser: 24 x 60mm (IDL, Nidderau)

Einwegpipetten: 2ml, 5ml, 10ml und 25ml (Corning & Costar, Bodenheim)

Halter für Vacutainer „Brand Needle Holders“ (Becton Dickinson, Heidelberg)

Kryoröhrchen: 5ml (Greiner, Solingen)

Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig)

Rundbodenröhrchen: 10ml (Greiner, Solingen)

Rollkulturflaschen: 850cm² (Corning & Costar, Bodenheim)

Vacutainer[®] CPTTM („Cell Preparation Tube“-)Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg)

Zellkulturflaschen: 12,5cm², 25cm², 75cm² und 225cm² (Falcon, Heidelberg)

Zentrifugenröhrchen: 10ml und 50ml (Falcon, Heidelberg oder Greiner, Solingen)

7.2.6. Laborgeräte

Autoklav: Varioklav-Dampfsterilisator (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)

Begasungsbrutschränke (Heraeus Instruments, Hanau)

Begasungsbrutschrank mit elektronisch gesteuertem Rollersystem (Tecnomara, Fernwald)

Casy 1: Zellanalysesystem „Model TT“ (Schärfe System, Reutlingen)

Channelyser: „Model 256“ (Coulter Electronics GmbH, Krefeld)

Coulter Counter: Zellanalysesystem „Model ZM“ (Coulter Electronics GmbH, Krefeld)

Durchflußcytometer PAS II mit Softwareprogramm MULTICYCLE (Partec, Münster)

Durchlichtmikroskop: Diavert (Leica, Wetzlar)

Eisbereiter (Scotsman/Frimont, Milano, Italy)

ELISA-Reader (BIO-TEK Instruments, Neufahrn)

Eppendorfpipetten (Eppendorf, Köln)

Flowboxen: Heraeus-LaminaAir Modell HLB (Heraeus Instruments, Hanau)

Flowboxen: Hera Safe (Heraeus Instruments, Hanau)

Kleinschüttler: Minishaker MS2 (IKA, Wilmington, USA)

Kleinschüttler: Bioblock Scientific 35213 (IKA, Wilmington, USA)

Kühl- und Gefrierschränke (Bosch, Stuttgart; AEG, Nürnberg; Liebherr, Ochsenhausen)

Labor-Spülautomat G7783 Mielabor (Miele, Gütersloh)

Megafuge 1.0 mit Rotor 2704 und Rechteckbecher #8030 (Heraeus Sepatech, Hanau)

MilliQ: System zur Herstellung von hochreinem Wasser (Millipore, Molsheim)

Minifuge RF, Rotor Kat.-Nr.: 2150 (Heraeus Sepatech, Hanau)

Glaspipetten (Eppendorf, Köln)

Pipettenhalter akku (Integra Biosciences, Fernwald; Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)

Röntgenröhre: IV320-12 (Seifert, Ludwigshafen)

Sterilisator (Heraeus Instruments, Hanau)

Stickstoffbehälter: GT80 (L'Air Liquide, Marne-la-Vallée Cedex 3, France)

Tiefkühlschrank: -80°C (Heraeus Instruments, Hanau)

Trockenschrank (Heraeus Instruments, Hanau)

Wasserbad: Isotemp 215 (Fisher Scientific, Wohlen, Schweiz)

Wasserbad: M12 (Lauda, Lauda-Königshofen)

Wasserbad: M20 (Lauda, Lauda-Königshofen)

Alle mikroskopischen Auswertungen wurden mit einem Mikroskop der Firma Leica (Typ DMRB) durchgeführt. Die weitere Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm ISIS (Version 1.90) der Firma Meta-Systems. Es wurden folgende Filterblöcke der Firma Leica für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe verwendet:

1. Blau (Dapi und Hoechst 33342)	A	513804
2. Grün (FITC)	I3	513808
3. Grün/Rot (FITC und Rhodamin)	G/R	513803
4. Rot (Rhodamin)	N2.1	513812

Für die Auswertung wurden Objektive mit 10, 40, 63 und 100facher Vergrößerung verwendet.

7.3. Tabellen

Auf den folgenden Seiten wurden die detaillierten Ergebnisse der Auswertung von Chromosomenaberrationen in Metaphasen der 1. und 2. Mitose nach Röntgenbestrahlung bzw. Bestrahlung mit 400MeV/u Kohlenstoffionen aufgeführt. Dies wurde vorgenommen um den Vergleich von Datensätzen zu ermöglichen, da häufig unterschiedliche Aberrationstypen in die Auswertung von Chromosomenschäden mit eingeschlossen werden. Die Aberrationsarten, die in Kapitel 3.13. näher erläutert wurden, wurden nach der ISCN Nomenklatur (ISCN, 1978) abgekürzt.

Abkürzungen zu den Tabellen:

Aberrat.	Aberrationen
ausgew.	ausgewertete
csb	Chromosomenbrüche
ctb	Chromatidbrüche
cte	Chromatidaustauschaberrationen
dic	Summe der dizentrischen Chromosomen mit und ohne azentrischem Fragment und der umgerechneten trizentrischen Chromosomen ($1 \times \text{tri} = 2 \times \text{dic}$).
dmin	Summe der interstitiellen Deletionen und azentrischen Ringe
n.b.	nicht bestimmt (im folgenden durch „-“ ersetzt)
r	zentrische Ringe mit und ohne azentrischem Fragment
SCEs	Schwesterchromatidaustausche („sister chromatid exchanges“)

Zeit [h]	Probe	ausgew. Mitosen	aberrante Zellen [%]	Aberrationen in der 1. Mitose (normiert auf 100 Mitosen)						Aberrat. in 100 Zellen	Mitoseindex [%]	Anteil der Metaphasen in der		
				ctb	csb	dmin	dic	r	cte			1. Mitosen [%]	2. Mitosen [%]	≥ 3. Mitosen [%]
48	K	100	6	4	2	0	0	0	0	6	1,8	98,6	1,4	0
	1 Gy	100	38	17	7	13	14	3	0	54	1,8	100	0	0
	2 Gy	100	62	9	28	14	41	1	0	93	1,3	100	0	0
	4 Gy	100	90	6	92	50	113	9	1	271	0,2	100	0	0
52	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	94,1	5,9	0
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	94,9	5,1	0
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,6	97,6	2,4	0
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	99,7	0,3	0
56	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	53,6	45,9	0,5
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	74,3	25,7	0
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2	77,8	22,0	0,2
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	98,1	1,9	0
60	K	100	2	0	2	0	0	0	0	2	3	39,9	57	3,1
	1 Gy	100	38	2	27	7	18	0	0	54	3,1	42,6	56,4	1
	2 Gy	100	64	1	34	13	40	3	0	91	2,4	49,1	50,1	0,8
	4 Gy	100	94	2	105	51	119	4	0	281	1,6	86	14	0
64	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9	32,6	52,5	14,9
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3	35,4	53,8	10,8
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7	43,5	48,4	8,2
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	66,6	31,6	1,8
68	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1	34,6	46,2	19,2
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,8	23,5	46	30,5
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,4	25,9	30,5	43,6
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1	54,9	38,7	6,4

Tabelle 7.1: Untersuchung der PBLs von Spender 1 48 – 96h nach Röntgenbestrahlung (Experiment A). Ausgewertet wurden Chromosomenschäden in der 1. Mitose nach Bestrahlung, der Mitoseindex sowie der prozentuale Anteil an Metaphasen in der 1., 2. und ≥ 3. Mitose. Abkürzungen zu der Tabelle siehe Seite 102.

Zeit [h]	Probe	ausgew. Mitosen	aberrante Zellen [%]	Aberrationen in der 1. Mitose (normiert auf 100 Mitosen)						Aberrat. in 100 Zellen	Mitose-index [%]	Anteil der Metaphasen in der		
				ctb	csb	dmin	dic	r	cte			1. Mitose [%]	2. Mitose [%]	≥ 3. Mitose [%]
72	K	100	3	0	1	2	0	0	0	3	4,2	14,2	35,1	50,7
	1 Gy	100	40	1	17	18	20	3	0	59	2,5	14,5	39,9	45,6
	2 Gy	100	59	6	21	17	47	1	0	92	2,2	18,8	43,9	37,3
	4 Gy	100	94	4	79	91	109	11	1	295	1,7	40,4	47,1	12,5
76	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	4	5,1	15,1	79,8
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,9	8,5	22,1	69,4
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	13,5	22,2	64,3
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	31,4	41,6	27
80	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	5	4,9	18,8	76,3
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9	5,1	12,7	82,1
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	6,8	17,9	75,3
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	19,1	41,9	39
84	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	5,5	1,2	10,9	87,9
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	6	3,4	10,9	85,7
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9	3,9	18,8	77,3
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,3	15,3	37,2	47,5
88	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	5,2	1,8	19,5	78,7
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	5,2	1,8	11,3	86,9
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3	0,4	13,2	86,4
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3,5	27,5	69
92	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9	1,9	8,6	89,5
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	4,2	1	10	89
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0,6	5,8	93,6
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	0,4	18,5	81,1

Tabelle 7.1 (Fortsetzung): Untersuchung der PBLs von Spender 1 76 – 92h nach Röntgenbestrahlung (Experiment A). Abkürzungen zu der Tabelle siehe Seite 102.

Zeit [h]	Probe	ausgew. Mitosen	aberrante Zellen [%]	Aberrationen in der 1. Mitose (normiert auf 100 Mitosen)						Aberrat. in 100 Zellen	Mitoseindex [%]	Anteil der Metaphasen in der		
				ctb	csb	dmin	dic	r	cte			1. Mitose [%]	2. Mitose [%]	≥ 3. Mitose [%]
96	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,8	1,2	6,9	91,9
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,8	1,4	7,1	91,5
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,6	16	15,1	68,9
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,2	6,2	24,3	69,5

Tabelle 7.1 (Fortsetzung): Untersuchung der PBLs von Spender 1 96h nach Röntgenbestrahlung (Experiment A). Abkürzungen zu der Tabelle siehe Seite 102.

Zeit [h]	Probe	ausgew. Mitosen	aberrante Zellen [%]	Aberrationen in der 1. Mitose (normiert auf 100 Mitosen)						Aberrat. in 100 Zellen	Mitoseindex [%]	Anteil der Metaphase in der		
				ctb	csb	dmin	dic	r	cte			1. Mitose [%]	2. Mitose [%]	≥ 3. Mitose [%]
48	K	100	2	0	2	0	1	0	0	3	3,4	95,1	4,9	0
	1 Gy	100	40	1	22	6	23	1	0	53	2,6	97,9	2,1	0
	2 Gy	100	64	1	31	15	54	3	0	104	2,5	98,9	1,1	0
	4 Gy	100	96	0	68	52	118	3	0	241	1,6	100	0	0
72	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1	-	-	-
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,6	-	-	-

Tabelle 7.2: Untersuchung der PBLs von Spender 1 48 und 72h nach Röntgenbestrahlung (Experiment B). Ausgewertet wurden Chromosomenschäden in der 1. Mitose nach Bestrahlung, der Mitoseindex sowie der prozentuale Anteil an Metaphasen in der 1., 2. und ≥ 3. Mitose. Abkürzungen zu der Tabelle siehe Seite 102.

Zeit [h]	Probe	ausgew. Mitosen	aberrante Zellen [%]	Aberrationen in der 1. Mitose (normiert auf 100 Mitosen)						Aberrat. in 100 Zellen	Mitose-index [%]	Anteil der Metaphasen in der		
				ctb	csb	dmin	dic	r	cte			1. Mitose [%]	2. Mitose [%]	≥ 3. Mitose [%]
48	K	100	1*	0	0(1)	0(2)	1(4)	0	0	1*	1,3	97,6	2,4	0
	1 Gy	100	65	4	25	21	64	2	0	116	1	100	0	0
	2 Gy	100	83	-	45	44	133	6	0	228	0,3	100	0	0
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	100	0	0
60	K	100	3	2	0	1	0	0	0	3	3,2	40,6	54,4	5,0
	1 Gy	100	77	8	49	40	50	6	0	153	1,7	66,7	32,5	0,8
	2 Gy	100	94	9	58	78	181	10	3	339	1,8	84,1	15,7	0,2
	4 Gy	50	100	10	196	122	338	8	0	674	0,8	96,9	3,1	0
72	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	4,9	8	34,4	57,6
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	23,5	48,3	28,2
	2 Gy	100	97	6	86	105	161	18	0	376	1,8	43,3	48,2	8,5
	4 Gy	50	100	14	130	192	264	18	6	624	0,8	82,8	16,6	0,6
84	K	100	5	1	2	2	2	0	0	7	4,7	8,4	29,7	61,9
	1 Gy	100	66	3	29	34	69	3	0	137	3,7	13,1	32,4	54,5
	2 Gy	100	94	4	33	76	150	6	1	269	2,6	25,8	45,6	28,6
	4 Gy	95	100	-	106	201	335	23	0	665	1,4	46,5	46,7	6,8
96	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	5,4	3,9	36,8	59,3
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,8	13	42	45
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2	13	39,4	47,6
	4 Gy	50	100	6	130	194	284	20	2	636	0,8	54,1	30,6	15,3

Tabelle 7.3: Untersuchung der PBLs von Spender 1 48 – 96h nach 400MeV/u Kohlenstoffionenbestrahlung (LET=11keV/μm). Ausgewertet wurden Chromosomenschäden in der 1. Mitose nach Bestrahlung, der Mitoseindex sowie der prozentuale Anteil an Metaphasen in der 1., 2. und ≥ 3. Mitose. In der Kontrolle 48h nach Stimulation wurde eine schwergeschädigte Zelle („rogue cell“) gefunden und deren Anzahl an Aberrationen in Klammern angegeben. Abkürzungen zu der Tabelle siehe Seite 102.

* Ergebnisse ohne die Aberrationen der schwergeschädigten Zelle

Zeit [h]	Probe	ausgew. Mitosen	aberrante Zellen [%]	Aberrationen in der 1. Mitose (normiert auf 100 Mitosen)						Aberrat. in 100 Zellen	Mitoseindex [%]	Anzahl der Metaphasen in der		
				ctb	csb	dmin	dic	r	cte			1. Mitose [%]	2. Mitose [%]	≥ 3. Mitose [%]
48	K	100	2	1	1	0	0	0	0	2	2,8	72,2	27,6	0,2
	1 Gy	100	29	3	10	9	11	1	0	34	3,8	92,4	7,6	0
	2 Gy	100	64	1	32	16	37	2	0	88	3,1	95,5	4,5	0
	4 Gy	100	89	0	93	44	88	2	0	230	2,4	97,8	2,2	0
52	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,8	14,5	84	1,5
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,4	44,6	52,2	3,2
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,2	61,2	35,4	3,4
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2	87,7	12,3	0
56	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	5	7,8	81,9	10,3
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	5	26,6	71,4	2
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,8	34,4	62,5	3,1
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,8	71,6	27,5	0,9
60	K	100	5	1	3	0	1	0	0	5	7,3	11,5	50,4	38,1
	1 Gy	100	30	0	20	7	12	1	1	41	6,7	16,7	70,1	13,2
	2 Gy	100	57	1	26	14	43	0	0	84	6,1	24,3	65,7	10,1
	4 Gy	100	98	1	98	63	105	8	0	275	3,7	49,7	49,1	1,2
64	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	8,9	3,4	27,5	69,1
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	7,4	5,0	53	42
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	6	5,4	59	35,6
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7	25,4	71,2	11,7

Tabelle 7.4: Untersuchung der PBLs von Spender 2 48 – 96h nach Röntgenbestrahlung (Experiment B). Ausgewertet wurden Chromosomenschäden in der 1. Mitose nach Bestrahlung, der Mitoseindex sowie der prozentuale Anteil an Metaphasen in der 1., 2. und ≥ 3. Mitose. Abkürzungen zu der Tabelle siehe Seite 102.

Zeit [h]	Probe	ausgew. Mitosen	aberrante Zellen [%]	Aberrationen in der 1. Mitose (normiert auf 100 Mitosen)						Aberrat. in 100 Zellen	Mitose-Index in [%]	Anteil der Metaphasen in der		
				ctb	csb	dmin	dic	r	cte			1. Mitose [%]	2. Mitose [%]	≥ 3. Mitose [%]
68	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	9	1,9	17,3	80,8
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	8,9	0,9	32,8	66,3
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	4,5	0	43,7	56,3
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	0,5	61,4	38,0
72	K	100	3	1	2	0	0	0	0	3	7,9	1,3	15,4	83,3
	1 Gy	100	23	0	16	5	11	1	0	33	7,5	6,4	12,7	80,9
	2 Gy	100	55	3	46	7	36	0	1	93	5,9	7,6	30,6	61,8
	4 Gy	100	94	2	97	23	110	5	2	239	4,1	28,5	52,8	18,7
76	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	6,2	0,6	5,8	93,5
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	6,5	0,8	11,3	87,9
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1,3	22,1	76,6
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	5,3	48,0	46,7
80	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	8,1	0,6	20,2	79,2
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	9,8	0,6	16,4	83,0
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	7,5	0	16,5	83,6
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7	1,7	43,6	54,8
84	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	5,2	0,6	23,8	75,7
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	5,9	0,4	17,3	82,3
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	6,3	0,4	6,6	93,0
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1,2	25,7	73,1

Tabelle 7.4 (Fortsetzung): Untersuchung der PBLs von Spender 2 68 – 84h nach Röntgenbestrahlung (Experiment B). Abkürzungen zu der Tabelle siehe Seite 102.

Zeit [h]	Probe	ausgew. Mitosen	aberrante Zellen [%]	Aberrationen in der 1. Mitose (normiert auf 100 Mitosen)						Aberrat. in 100 Zellen	Mitoseindex [%]	Anteil der Metaphasen in der		
				ctb	csb	dmin	dic	r	cte			1. Mitose [%]	2. Mitose [%]	≥ 3. Mitose [%]
88	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	6,6	0,2	10,9	88,9
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	7,7	0	38,7	61,3
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	5,5	0	9,6	90,4
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	5	0,3	30,7	69,0
92	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	4,7	0	6,7	93,3
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0,2	22,2	77,6
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	5	0	8,8	91,2
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	17,2	82,8
96	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1	0	14,3	85,7
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	5,2	0	19,3	80,7
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	4,7	0	7,0	93,0
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0	18,4	81,6

Tabelle 7.4 (Fortsetzung): Untersuchung der PBLs von Spender 2 88 – 96h nach Röntgenbestrahlung (Experiment B). Abkürzungen zu der Tabelle siehe Seite 102.

Zeit [h]	Probe	ausgew. Mitosen	aberrante Zellen [%]	Aberrationen in der 1. Mitose (normiert auf 100 Mitosen)						Aberrat. in 100 Zellen	Mitoseindex [%]	Anteil der Metaphasen in der		
				ctb	csb	dmin	dic	r	cte			1. Mitose [%]	2. Mitose [%]	≥ 3. Mitose [%]
48	K	100	2	1	1	0	0	0	0	2	6,2	96,7	3,3	0
	1 Gy	100	36	2	12	9	19	0	0	42	4,9	98	2	0
	2 Gy	100	57	2	25	15	34	2	0	78	4,5	99,1	0,9	0
	4 Gy	100	78	0	73	41	68	1	0	183	2,1	99,9	0,1	0

Tabelle 7.5: Untersuchung der PBLs von Spender 2 48h nach Röntgenbestrahlung (Experiment A). Ausgewertet wurden Chromosomenschäden in der 1. Mitose nach Bestrahlung, der Mitoseindex sowie der prozentuale Anteil an Metaphasen in der 1., 2. und ≥ 3. Mitose. Abkürzungen zu der Tabelle siehe Seite 102.

Zeit [h]	Probe	ausgew. Mitosen	aberrante Zellen [%]	Aberrationen in der 1. Mitose (normiert auf 100 Mitosen)						Aberrat. in 100 Zellen	Mitoseindex [%]	Anteil der Metaphasen in der		
				ctb	csb	dmin	dic	r	cte			1. Mitosen [%]	2. Mitosen [%]	≥ 3. Mitosen [%]
48	K	100	2	1	0	0	0	0	1	2	1	97,4	2,6	0
	1 Gy	100	25	3	7	5	14	0	0	29	0,2	100	0	0
	2 Gy	67	57	3	36	7	42	3	0	91	0,2	99,6	0,4	0
	4 Gy	23	78	0	61	26	122	0	0	209	0	100	0	0
52	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	-	-	-
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-
56	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-
60	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	-	-	-
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-
64	K	100	5	2	0	1	2	0	0	5	1,4	42	49,5	8,5
	1 Gy	100	21	1	9	7	18	0	0	35	0,5	60,5	36,6	2,9
	2 Gy	87	61	8	34	21	33	3	0	99	0,9	58,1	38,1	3,8
	4 Gy	48	90	2	102	27	140	2	2	275	0,4	87,3	12,2	0,5
68	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
	2 Gy	55	71	4	27	16	51	2	0	100	1,3	41,1	51,3	7,6
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-

Tabelle 7.6: Untersuchung der PBLs von Spender 2 48 – 96h nach 400MeV/u Kohlenstoffionenbestrahlung (LET=11keV/μm). Ausgewertet wurden Chromosomenschäden in der 1. Mitose nach Bestrahlung, der Mitoseindex sowie der prozentuale Anteil an Metaphasen in der 1., 2. und ≥ 3. Mitose. Abkürzungen zu der Tabelle siehe Seite 102.

Zeit [h]	Probe	ausgew. Mitosen	aberrante Zellen [%]	Aberrationen in der 1. Mitose (normiert auf 100 Mitosen)						Aberrat. in 100 Zellen	Mitose-index [%]	Anteil der Metaphasen in der		
				ctb	csb	dmin	dic	r	cte			1. Mitose [%]	2. Mitose [%]	≥ 3. Mitose [%]
72	K	100	1	1	0	0	0	0	0	1	2	28,6	33,8	37,6
	1 Gy	100	26	4	5	2	21	1	0	33	1,3	32,2	45,2	22,5
	2 Gy	95	64	4	46	13	57	1	0	121	0,3	45,7	41,8	12,5
	4 Gy	100	91	5	94	32	109	5	1	246	0,9	55,8	41,1	3,1
76	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	-	-	-
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	-	-	-
80	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,4	-	-	-
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	-	-	-
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-
	4 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-	-
84	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,6	-	-	-
	1 Gy	41	24	7	2	5	10	0	0	24	3,2	24	23	53
	2 Gy	35	66	3	54	20	60	0	0	137	1,6	30,6	34,9	34,5
	4 Gy	45	91	2	69	44	122	7	0	244	1,9	36,3	39,7	24
96	K	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,6	-	-	-
	1 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	-	-	-
	2 Gy	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-
	4 Gy	39	87	5	74	49	108	5	0	241	1,6	29,1	39,1	31,8

Tabelle 7.6 (Fortsetzung): Untersuchung der PBLs von Spender 2 72 – 96h nach 400MeV/u Kohlenstoffionenbestrahlung (LET=11keV/μm). Abkürzungen zu der Tabelle siehe Seite 102.

Zeit [h]	Probe	ausgew. Mitosen	aberrante Zellen [%]	Aberrationen in der 2. Mitose (normiert auf 100 Mitosen)						Aberrat. in 100 Zellen	SCEs pro Metaphase (46 Chromosomen)
				ctb	csb	dmin	dic	r	cte		
60	K	100	1	0	1	0	0	0	0	1	9,6
	1 Gy	67	13,4	0	10	3	4	0	0	17	8,1
	2 Gy	50	12	2	12	2	6	0	0	22	8,9
72	K	100	3	1	2	0	0	0	0	3	5,8
	1 Gy	100	13	1	7	3	5	0	0	16	8,3
	2 Gy	100	30	1	9	10	15	2	0	37	7,9
	4 Gy	44	59,1	0	43	39	30	16	0	128	9,4

Tabelle 7.7: Untersuchung der PBLs von Spender 1 60 und 72h nach Röntgenbestrahlung (Experiment A). Ausgewertet wurden Chromosomenschäden in der 2. Mitose nach Bestrahlung sowie die Anzahl an SCEs pro Metaphase. Abkürzungen zu der Tabelle siehe Seite 102.

Zeit	Probe	ausgew. Mitosen	aberrante Zellen [%]	Aberrationen in der 2. Mitose (normiert auf 100 Mitosen)						Aberrat. in 100 Zellen	SCEs pro Metaphase (46 Chromosomen)
				ctb	csb	dmin	dic	r	cte		
60	K	100	2	1	0	0	1	0	0	2	9,3
	1 Gy	29	48,3	3	28	38	7	0	0	76	9,5
	2 Gy	13	76,9	0	85	38	54	31	0	208	9,2
72	2 Gy	53	67,9	0	79	45	68	17	0	209	9,3
84	K	100	3	0	2	1	0	0	0	3	7,8
	1 Gy	100	28	1	16	16	15	0	0	48	8,5
	2 Gy	100	63	1	35	43	56	6	0	141	7,1
	4 Gy	26	92,3	4	31	54	169	12	0	270	10,3
96	4Gy	15	100	0	73	73	147	7	0	300	0

Tabelle 7.8: Untersuchung der PBLs von Spender 1 60 – 96h nach 400MeV/u Kohlenstoffionenbestrahlung (LET=11keV/μm). Ausgewertet wurden Chromosomenschäden in der 2. Mitose nach Bestrahlung sowie die Anzahl an SCEs pro Metaphase. Abkürzungen zu der Tabelle siehe Seite 102.

Zeit	Probe	ausgew. Mitosen	aberrante Zellen [%]	Aberrationen in der 2. Mitose (normiert auf 100 Mitosen)						Aberrat. in 100 Zellen	SCEs pro Metaphase (46 Chromosomen)
				ctb	csb	dmin	dic	r	cte		
48	K	41	0	0	0	0	0	0	0	0	8,9
60	K	100	0	0	0	0	0	0	0	0	7,2
	1 Gy	100	10	0	6	3	7	0	0	16	10,2
	2 Gy	100	25	0	13	6	15	5	0	39	9,8
	4 Gy	100	58	0	60	23	31	7	0	126	7,9
72	K	100	0	0	0	0	0	0	0	0	6,6
	1 Gy	100	15	0	10	4	6	0	0	20	7,3
	2 Gy	100	32	1	21	7	15	1	0	45	7,6
	4 Gy	100	45	0	39	9	33	3	1	85	8,6

Tabelle 7.9: : Untersuchung der PBLs von Spender 2 48 – 72h nach Röntgenbestrahlung (Experiment B). Ausgewertet wurden Chromosomenschäden in der 2. Mitose nach Bestrahlung sowie die Anzahl an SCEs pro Metaphase. Abkürzungen zu der Tabelle siehe Seite 102.

Zeit [h]	Probe	ausgew. Mitosen	aberrante Zellen [%]	Aberrationen in der 2. Mitose (normiert auf 100 Mitosen)						Aberrat. in 100 Zellen	SCEs pro Metaphase (46 Chromosomen)
				ctb	csb	dmin	dic	r	cte		
64	K	100	5	2	2	1	1	0	0	6	6,1
	1 Gy	52	5,8	0	4	0	6	2	0	12	6,2
	2 Gy	48	22,9	2	8	21	6	4	0	41	7,5
	4 Gy	13	61,5	0	69	15	38	8	0	130	7,8
68	2 Gy	43	25,6	0	14	7	16	0	0	37	6,9
72	K	100	2	1	1	0	0	0	0	2	6,3
	1 Gy	100	10	0	8	0	9	2	0	18	8,9
	2 Gy	59	20,3	0	19	0	12	5	0	36	8,5
	4 Gy	48	60,4	2	63	10	67	0	0	142	6,9
84	1 Gy	49	14,3	0	6	4	6	0	0	16	7,8
	2 Gy	27	44,4	0	52	0	30	0	0	82	7,1
	4 Gy	22	59,1	0	45	14	55	9	0	123	7
96	4Gy	14	57,1	0	64	7	36	7	0	114	7,7

Tabelle 7.10: Untersuchung der PBLs von Spender 2 64 – 96h nach 400MeV/u Kohlenstoffionenbestrahlung (LET=11keV/μm). Ausgewertet wurden Chromosomenschäden in der 2. Mitose nach Bestrahlung sowie die Anzahl an SCEs pro Metaphase. Abkürzungen zu der Tabelle siehe Seite 102.

8. Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Abteilung Biophysik der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Kraft und der Mitwirkung von Frau Dr. S. Ritter in der Zeit von Januar 1999 bis August 2002 angefertigt.

Prof. Dr. Gerhard Kraft möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit danken. Er stand stets als Ansprechpartner bereit und engagierte sich auch für meine berufliche Zukunft.

Prof. Dr. Paul Layer danke ich für die Betreuung an der TU Darmstadt und die Übernahme der Mitberichterstattung, wodurch eine externe Dissertation ermöglicht wurde.

Dr. Sylvia Ritter möchte ich für die langjährige Unterstützung danken, die weit über den Zeitraum der Dissertation hinausreicht. Sie war nicht nur am Fortgang der vorliegenden Arbeit entscheidend beteiligt, sondern auch an meinem bisherigen wissenschaftlichen Werdegang. Hierfür möchte ich ihr ganz herzlich danken!

Petra Hessel danke ich ganz herzlich für ihre Mithilfe bei der Durchführung und Auswertung der Experimente. Ihre aufmunternden Worte waren häufig eine sehr große Hilfe.

Danken möchte ich ganz besonders Dr. Michael Scholz und Dr. Thomas Haberer, die nicht nur die Strahlzeitplanung durchführten sondern sich auch für Fragen und Problemlösungen stets Zeit nahmen sowie Dr. Eike Rietzel, der Rechner- und Druckerprobleme meisterte.

Dr. Elena Nasonova danke ich für die Mithilfe bei Experimenten und der Einführung in die Chromosomenanalyse sowie der Kontrolle erster eigener Auswertungen.

Prof. Dr. Ewa Gudowska-Nowak möchte ich für ihre freundliche Hilfe bei statistischen und mathematischen Problemstellungen danken.

Prof. Dr. Marco Durante möchte ich für die Hilfestellungen beim Umgang mit peripheren Blutlymphozyten und der Unterstützung beim ersten gemeinsam durchgeführten Experiment danken.

Für die stetige Unterstützung im Labor möchte ich allen MTAs sowie Studenten/innen herzlich danken. Ein großes Dankeschön gebührt Petra Sander, die durch ihre Mithilfe und einige Überraschungen die Arbeit nicht nur erleichterte sondern auch unterhaltsam gestaltete.

Den Ingenieuren und Dosimetristen möchte ich für die reibungslosen Strahlzeiten danken und für ihre Unterstützung nicht nur während der Bestrahlung.

Vielen Dank auch an meine Mitdoktoranden und die gesamte Teerunde. Häufig konnten hier kleinere Probleme oder Fragen schnell und unkompliziert gelöst werden.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, die eine sehr angenehme als auch freundliche Arbeitsatmosphäre schafften und die durch ihre stetige Hilfsbereitschaft das Arbeiten erleichterten, sowie den freiwilligen Blutspendern danken, die diese Arbeit letztendlich erst ermöglichten.

Lebenslauf

Name Größer, Torsten
Geburtsdatum/ort 05.01.1972 in Darmstadt
Familienstand ledig

Schulabschluss

1991 Abitur (Gymnasium, Gernsheim)
Leistungsfächer: Biologie, Mathematik

Wehrdienst

1991 – 1992 Bundeswehr: Kampftruppenschule 1, Hammelburg

Studium

1992 – 1998 Biologie (TU Darmstadt)
Schwerpunkte: Zoologie, Biochemie
Thema der Diplomarbeit: Untersuchung strahleninduzierter Chromosomenaberrationen mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung
Prof. Dr. G. Kraft (GSI, Darmstadt), Prof. Dr. P. Layer (TU Darmstadt)

Tätigkeiten

1994 – 1998 Werkstudent bei der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI, Darmstadt), Abteilung Biophysik (Prof. Dr. G. Kraft)
1996 – 1997 Praktikumbetreuung in der Zoologie (GP I) und Tierphysiologie (Prof. Dr. W. Kaiser, TU Darmstadt)
seit Jan. 1999 Promotion bei der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI, Darmstadt), Abteilung Biophysik (Prof. Dr. G. Kraft)

Publikationen

- Größer, T., P. Hessel, S. Ritter, E. Nasonova, E. Gudowska-Nowak (2002). Use of human lymphocytes for radiation risk assessment. In: GSI Scientific Report 2001 (GSI-2002-1 ISSN 0174-0814), S. 161.
- Ritter, S., S. Berger, T. Größer, P. Hessel, G. Kraft, E. Nasonova, K. Ando, E. Gudowska-Nowak (2001). Quantification of high LET induced chromosome aberrations. In: GSI Scientific Report 2000 (GSI-2001-1 ISSN 0174-0814), S. 154.
- Berger, S., T. Größer, S. Ritter, E. Nasonova, G. Kraft (2000). Influence of cell cycle effects on the calculation of RBEs from chromosome aberration data. 7th Workshop on heavy charged particles in biology and medicine, 28. – 30. September 2000, Darmstadt, GSI Report 2000 – 04.
- Ritter, S., S. Berger, T. Größer, P. Hessel, E. Nasonova, E. Gudowska-Nowak, G. Kraft (2000). Biological effects of heavy ion exposure to human skin fibroblasts and their LET dependence. In: GSI Scientific Report 1999 (GSI-2000-1 ISSN 0174-0814), S. 154.
- Berger S., S. Ritter, T. Größer, E. Nasonova, G. Kraft (1999). Biological effects of heavy ion exposure to human skin fibroblasts. 3. Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology, Ermatingen, Schweiz, S. 33.
- Ritter, S., S. Berger, T. Größer, E. Gudowska-Nowak, P. Hessel, E. Kehr, E. Nasonova, G. Kraft (1999). High LET induced chromosomal damage in human fibroblasts. In: GSI Scientific Report 1998 (GSI-1999-1 ISSN 0174-0814), S. 134.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt, sowie noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Darmstadt, August 2002