

**Mikronuklei als Indikatoren nach Bestrahlung  
und  
Charakterisierung ihrer Entstehung mit Hilfe von DNA-Sonden**

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.  
des Fachbereiches Bio- und Geowissenschaften  
an der  
Universität-Gesamthochschule Essen

vorgelegt von  
**Anna Kryscio**

aus Wysokie Mazowieckie (Polen)

Essen, im November 1999

## Abkürzungen

Bn	binukleäre Zelle
bp	Basenpaar
Bq	Becquerel
Cyt B.	Cytochalasin B
Di	Dispersions-Index
FISH	Fluorescence in situ Hybridization
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälber Serum
G	gesunde Spender
GPA	Glycophorin A
Gy	Gray
kbp	Kilobasenpaar
KCl	Kalium-Chlorid
LET	linearer Energie-Transfer
Mn	Mikronukleus
MnC+	Centromer-positive Mikronuklei
MnC-	Centromer-negative Mikronuklei
mSv	milliSievert
Mw	Mittelwert
PBS	Phosphate buffered Saline
PCC	Premature Chromosome Condensation
pCi	pikoCurie
PHA	Phytohämagglutinin
PWM	Pokeweed Mitogen
SSC	Saline-Sodium citrate buffer
TCR/TZR	T-Zell-Rezeptor
TLD-Kristall	Thermo-Lumineszenz-Detektor-Kristall
Ü	Überverteilung
W	Wismut-Arbeiter ohne Tumor
WLM	Working level month
WT	Wismut-Arbeiter mit Tumor ohne Strahlentherapie
WTS	Wismut-Arbeiter mit Tumor nach Strahlentherapie

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Physikalische Dosimetrie</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Biologische Dosimetrie</b> .....	<b>1</b>
1.2.1	Radiogen induzierte cytogenetische Effekte in Lymphocyten.....	3
1.2.2	Steigerung der Empfindlichkeit des Mikronukleustestes im niedrigen Dosisbereich.....	8
<b>1.3</b>	<b>Der Hintergrund der Untersuchungen am Blut von ehemaligen Wismut-Arbeitern</b> .....	<b>13</b>
1.3.1	Geschichte der Wismut AG.....	13
<b>1.4.</b>	<b>Aufgabe der vorliegenden Arbeit</b> .....	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>17</b>
2.1.1	Probanden.....	17
2.1.2	Puffer, Lösungen und Reagenzien.....	18
2.1.3	Geräte.....	24
2.1.4	Glaswaren.....	25
2.1.5	Plastikwaren.....	25
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>26</b>
2.2.1	Bestrahlung.....	26
2.2.2	Vollblut-Kulturen für den Mikronukleustest und die Chromosomenaberrationenbestimmung.....	26
2.2.3	Nachweis von Mikronukei in binukleären Lymphocyten.....	27
2.2.4	Färbung und Auswertung der Mikronuklei beim Mikronukleustest.....	28
2.2.5	Färbung und Auswertung der Mikronuklei beim Mikronukleustest mit FISH-Technik.....	28
2.2.6	Nachweis von Chromosomenaberrationen.....	33
2.2.7	Statistik.....	34
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Proliferation der Lymphocyten nach in vitro Bestrahlung mit Röntgenstrahlen</b> .....	<b>35</b>
3.1.1	Proliferationsrate in unbestrahlten Lymphocyten.....	35

3.1.2	Proliferationsrate in bestrahlten Lymphocyten.....	38
<b>3.2</b>	<b>Analyse von Mikronuklei in binukleären Lymphocyten.....</b>	<b>44</b>
3.2.1	Mikronuklei in unbestrahlten Lymphocyten.....	44
3.2.2	Dosiswirkungsbeziehung nach in vitro Bestrahlung.....	48
3.2.3	Statistische Verteilung der Mikronuklei in binukleären Lymphocyten.....	57
<b>3.3</b>	<b>Analyse von Centromersignalen in Mikronuklei.....</b>	<b>58</b>
3.3.1	Centromer-positive Mikronuklei in unbestrahlten Lymphocyten.....	58
3.3.2	Centromer-positive Mikronuklei in bestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender.....	62
3.3.3	Statistische Kombination der Ergebnisse des Mikronukleustestes und der Centromer-Analyse bei gesunden Spendern.....	64
<b>3.4</b>	<b>Analyse von Chromosomenaberrationen.....</b>	<b>65</b>
3.4.1	Proliferationsrate in Lymphocyten.....	65
3.4.2	Chromosomenaberrationen in unbestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender (G) und Wismut-Arbeiter mit Tumor (WT, WTS).....	68
3.4.3	Korrelation zwischen Mikronukleushäufigkeit und Chromosomenaberrationen.....	70
3.4.4	Korrelation zwischen Centromer-positiven Mikronuklei und Chromosomenaberrationen.....	70
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Randbedingungen des Mikronukleustestes.....</b>	<b>71</b>
<b>4.2</b>	<b>Proliferation der Lymphocyten.....</b>	<b>72</b>
<b>4.3</b>	<b>Dosiswirkungsbeziehung der Mikronukleusfrequenz nach in vitro Bestrahlung der Lymphocyten.....</b>	<b>73</b>
<b>4.4</b>	<b>Empfindlichkeit des Mikronukleustestes im niedrigen Dosisbereich.....</b>	<b>77</b>
4.4.1	Lymphocyten Subpopulationen.....	78
4.4.2	Steigerung der Empfindlichkeit des Mikronukleustestes durch den Centromernachweis mit FISH-Sonden.....	79
<b>4.5</b>	<b>Chromosomenaberrationen und Genomische Instabilität.....</b>	<b>86</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>90</b>
<b>5.1</b>	<b>Randbedingungen des Mikronukleustestes.....</b>	<b>90</b>
<b>5.2</b>	<b>Dosiswirkungsbeziehung der Mikronukleusfrequenz in binukleären Lymphocyten.....</b>	<b>91</b>

<b>5.3</b>	<b>Analyse von Centromersignalen in Mikronuklei</b> .....	<b>92</b>
5.3.1	Centromer-positive Mikronuklei in bestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender.....	92
<b>5.4</b>	<b>Statistische Kombination der Ergebnisse des Mikronukleustestes und der Centromer-Analyse bei gesunden Spendern</b> .....	<b>93</b>
<b>5.5</b>	<b>Analyse von Chromosomenaberrationen</b> .....	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>94</b>

## **1. Einleitung**

Die mutagene Wirkung von ionisierender Strahlung auf Körperzellen ist allgemein bekannt. Das Ausmaß der Zellschädigung ist dabei unter anderem abhängig von der Strahlendosis. Im Rahmen des Strahlenschutzes gilt es, vor allem grenzwertüberschreitende Expositionen festzustellen bzw. einzelne Personen oder Populationen vor einem erhöhten Expositionsrisiko zu schützen. Die Bestimmung einer Dosis, die beispielsweise eine Person während eines Strahlenunfalls erhalten hat, ist schwierig.

### **1.1 Physikalische Dosimetrie**

Bei beruflich strahlenexponierten Personen wird mit Hilfe von Dosimetern die Expositionsüberwachung durchgeführt. Durch physikalische Dosimetrie lassen sich unter bestimmten Umständen gute Abschätzungen über die lokale Strahlenexposition der bestrahlten Person machen. Dies setzt aber voraus, daß zur Zeit der Strahleneinwirkung ein geeigneter Meßsensor (Stabdosimeter, Filmplakette, TLD-Kristall) getragen wurde. Solche Meßgeräte erlauben jedoch nur eine lokale Dosismessung. Eine Abschätzung für die erhaltene Ganzkörperdosis ist oftmals nicht möglich. Weiterhin können die Folgen der Bestrahlung für unterschiedlich strahlensensitive Individuen mit physikalischer Dosimetrie nicht erfaßt werden.

### **1.2 Biologische Dosimetrie**

Die Aufgabe der „biologischen Dosimetrie“ ist die Abschätzung des Ausmaßes der Reaktion auf die Strahlendosis, die auf einen Organismus eingewirkt hat. Bei einem „biologischen Dosimeter“ werden die durch Strahlung hervorgerufenen Schädigungen auf zellulärer Ebene erfaßt. Neben der Dosisabschätzung kann die „biologische Dosimetrie“ weitere Anwendung finden im Hinblick auf die Risikoabschätzung bei der Ermittlung strahlenempfindlicher Personengruppen. Die „biologische Dosimetrie“ bietet daher unter verschiedenen Aspekten entscheidende Vorteile gegenüber der physikalischen Dosimetrie bzw. ergänzt diese. Gerade die Strahlenunfälle der letzten Jahre (Tschernobyl, Goiania) haben deutlich gezeigt, daß die physikalische Dosimetrie nur bedingt die notwendigen Daten liefert, wenn es um die

Feststellung der Dosen der Unfallopfer geht. Die für den Mediziner wesentliche Information stammte jeweils von der biologischen Dosimetrie (Guskova et al., 1988, Ramalho et al., 1988). Die Bestimmung biologischer Indikatoren nach einer Strahlenexposition hat sich aus folgenden Gründen als bedeutsam erwiesen (Streffler und Müller, 1994):

- 1 Es finden immer wieder Strahlenexpositionen statt, ohne daß eine physikalische Dosiskontrolle durchgeführt worden ist. Dieses gilt vor allem für unvorhergesehene, unfallartige Strahlenexpositionen (z.B. Tschernobyl, Goiania).
2. Untersuchungen in der letzten Jahren haben zunehmend gezeigt, daß die Strahlenempfindlichkeit von Menschen sehr unterschiedlich sein kann. Dies ist sehr häufig durch genetische Prädispositionen bedingt, d.h. durch Veränderungen im Genom, die das Auftreten von Strahleneffekten (z.B. von Tumoren) wahrscheinlicher machen. Biologische Indikatoren sollen in der Lage sein, den individuellen biologisch-medizinischen Strahlenschaden zu erfassen und damit sind auch die genetischen Komponenten zu berücksichtigen.
3. Es erhebt sich daher die Frage, ob durch Untersuchungen derartiger Indikatoren prognostische Werte ermittelt werden können, um besonders gefährdete exponierte Personen, z.B. mit einem erhöhten Tumorrisiko, zu erfassen und damit bessere arbeitsmedizinische Vorkehrungen treffen zu können.

Die biologischen Indikatoren müssen folgende Bedingungen erfüllen (für eine ausführliche Darstellung siehe Müller und Streffler, 1991):

- a) Gute Dosisabhängigkeit über einen weiten Dosisbereich: von 20-30 mSv für akute, 50 mSv für chronische Expositionen (Grenzwerte für berufliche Strahlenexpositionen) bis zu mehreren Gray (Exposition durch einen Strahlenunfall)
- b) Erfassung von Teilkörper-, fraktionierter oder chronischer Exposition, sowie der Exposition durch inkorporierte Radionuklide
- c) Zeitliche Stabilität; ist diese nicht gegeben, so muß die zeitliche Abhängigkeit des Abklingens des Strahleneffektes bekannt sein
- d) Sensitivität für verschiedene Strahlenqualitäten

- e) Hohe Spezifität für ionisierende Strahlung
- f) Einfache Materialgewinnung
- g) Einfache und rasche Auswertung

Zur Zeit gibt es kein biologisches Dosimeter, das alle genannten Anforderungen erfüllen würde. Je nach Expositionsbedingungen müssen verschiedene, sich ergänzende Indikatoren verwendet werden. Die Verwendung mehrerer sich ergänzender Techniken kann in bestimmten Unfallsituationen von großer Bedeutung sein (Müller und Streffer, 1993).

Die biologischen Indikatoren lassen sich in vier verschiedene Gruppen unterteilen (für eine Erläuterung der verschiedenen Systeme siehe Potten, 1986; Müller und Streffer, 1991; Straume et al., 1992) :

1. Indikatoren auf zellulärer Ebene (Hämopoese, Spermatogenese, Haare)
2. Effekte auf cytogenetischer Ebene (Chromosomenaberrationen, Mikronuklei und FISH-Technik, PCC)
3. Nachweismethoden auf molekularer Ebene (Elektronen-Spin Resonanz, biochemische Agenzien)
4. Indikatoren auf molekular-genetischer Ebene (GPA Locus Mutation, TZR-Mutation).

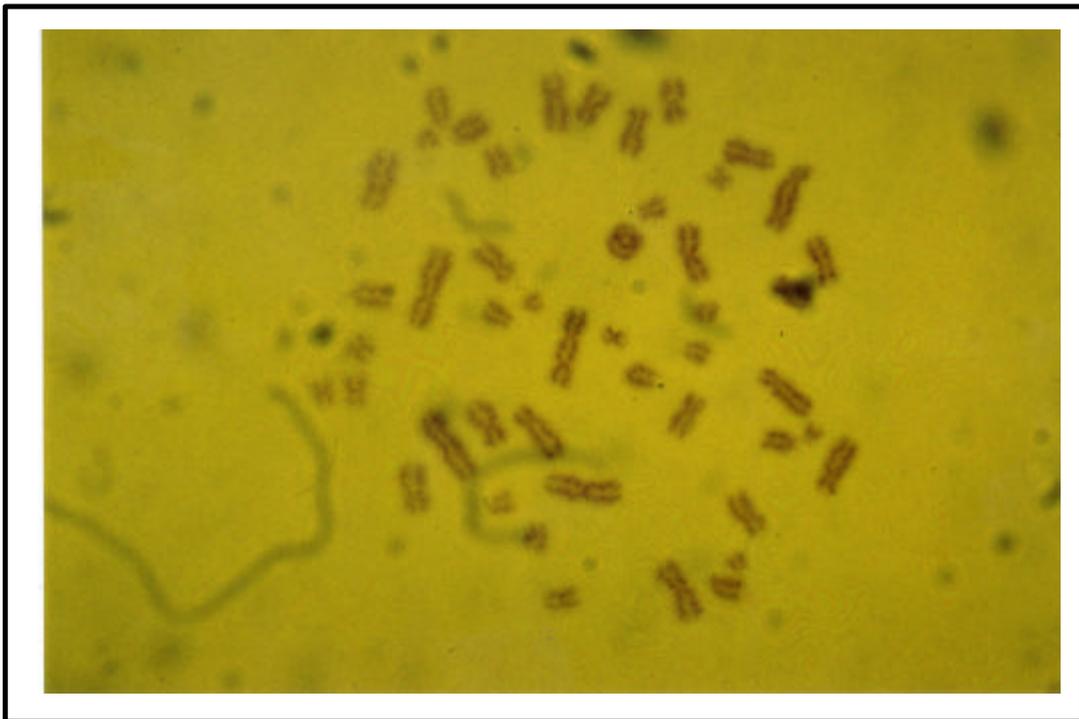
Die wichtigsten Verfahren stellen dabei die Vertreter der cytogenetischen Nachweismethoden dar.

## **1.2.1 Radiogen induzierte cytogenetische Effekte in Lymphocyten**

### **1.2.1.1 Chromosomenaberrationen**

Die Untersuchungen dizentrischer Chromosomen in Lymphocyten (Bild 1) gehören zu den bekanntesten und am weitesten entwickelten biologischen Indikatorsystemen (IEAA: Biological Dosimetry, 1986; Bender et al., 1988). Diese Austauschaberration entsteht durch Fusion von Bruchstücken zweier Chromosomen, von denen jedes ein Centromer besitzt und diese sollte von mindestens einem azentrischen Fragment begleitet sein. Durch eine sehr

geringe Spontanhäufigkeit (1-2 Dizenrische auf 2000 Metaphasen), eine relative Empfindlichkeit (beginnend bei etwa 0,05-0,1 Gy für eine akute Strahlenexposition mit niedriger LET-Strahlung), eine gute Dosisabhängigkeit bis in den Bereich einiger Gray und eine relativ gute Strahlenspezifität (einige Chemikalien, die ebenfalls Dizenrische induzieren können, sind bekannt), ergibt sich für dieses Meßsystem eine gewisse Spezifität. In den letzten Jahren haben sich viele Arbeiten daher auf die Bestimmung dizenrischer Chromosomenaberrationen konzentriert, allerdings ist dieser Test relativ arbeitsaufwendig und die Auswertung von Präparaten bei dieser Technik erfordert viel Erfahrung. Vor allem im niedrigen Dosisbereich (50 bis 100 mSv) ist der Aufwand sehr hoch, um statistisch verwertbare Ergebnisse zu erhalten. Außerdem handelt es sich hier um instabile Chromosomenaberrationen. Dies bedeutet, daß die Zellen mit solchen Schäden (mit biologischen Halbwertzeiten von wenigen Monaten) verschwinden. Die Persistenz dieses Effektes ist also gering (Streffler und Müller, 1994).



**Bild 1: Metaphaseplatte mit Chromosomenaberrationen (Dizenrisches Chromosom, azenrisches Fragment, Ringchromosom)**

### 1.3.1.1 Mikronuklei

Wesentlich einfacher und schneller lassen sich cytogenetische Veränderungen mit Hilfe des Mikronukleustestes erfassen. Mikronuklei sind ehemalige Bestandteile des Zellkernes, die auf unterschiedliche Weise (azentrische Chromosomenfragmente, multizentrische Chromosomen, Schädigung des Kinetochors, Schädigung des Spindelapparates) bei einer Zellteilung nicht in die Tochterzellkerne aufgenommen werden und als Chromatinpartikel im Cytoplasma erscheinen.

Voraussetzung für die Mikronukleusexpression ist im allgemeinen die Zellteilung. Zur Feststellung, ob eine Zelle die Mitose durchlaufen hat, setzten Fenech und Morley (1985 a, b) Cytochalasin B ein. Diese Substanz hat in bestimmten Konzentrationsbereichen (1-5 µg/ml) die Eigenschaft, die Zellteilung zu unterbinden, eine Kernteilung jedoch zuzulassen. Dadurch sind die Zellen, die eine Mitose durchlaufen haben, daran zu erkennen, daß sie zwei Zellkerne aufweisen („binukleate Zellen“). Die Mikronuklei werden ausschließlich in solchen Zellen gezählt (Bild 2, 3, 4).

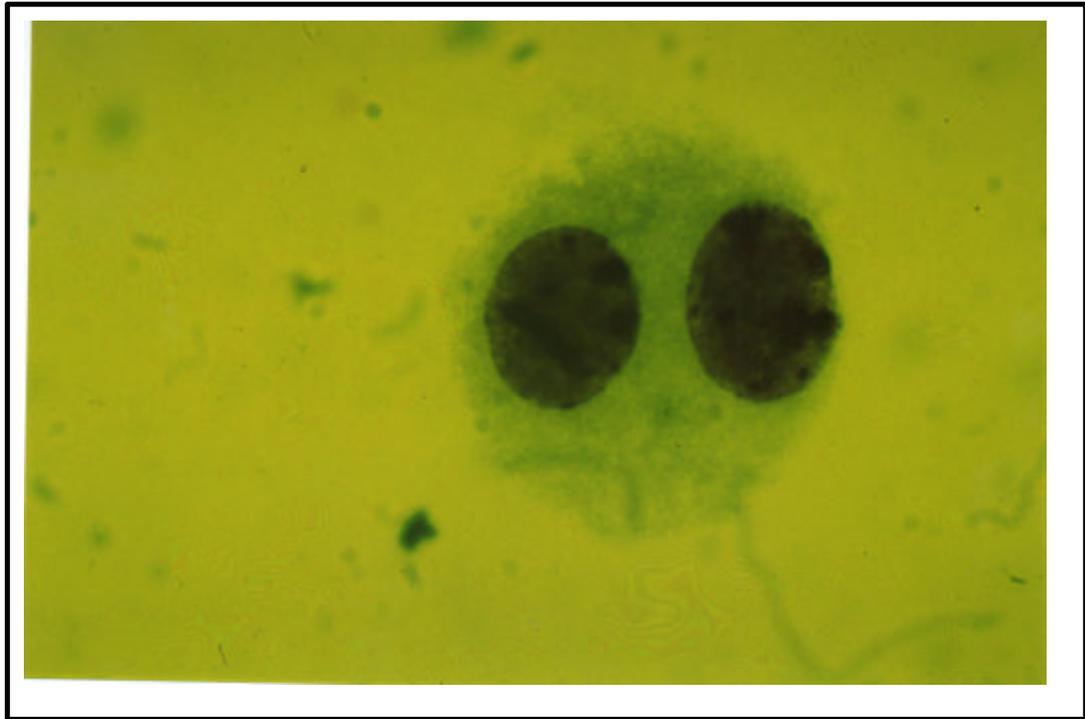
Seit der Einführung dieser Technik haben Mikronuklei als biologische Indikatoren weltweit Beachtung gefunden (Müller und Streffer, 1993). Dies liegt vor allem daran, daß die Mikronukleusauswertung im Gegensatz zur Auswertung der dizentrischen Chromosomen relativ einfach und schnell ist. Darüber hinaus ist die Automatisierung der Zählung von Mikronuklei leichter durchführbar, als dies bei Chromosomenaberrationen der Fall ist und in einigen Laboratorien bereits weit fortgeschritten ist (Verhaegen et al., 1994; Böcker et al., 1996).

Zellen mit einer Mikronukleusexpression sind ebenso wie die Zellen mit dizentrischen Chromosomen instabile Zellen (Müller und Streffer 1993). Es kommt innerhalb weniger Monate daher zu einem Verlust dieser Zellen und der direkte Strahleneffekt kann dann nicht mehr festgestellt werden.

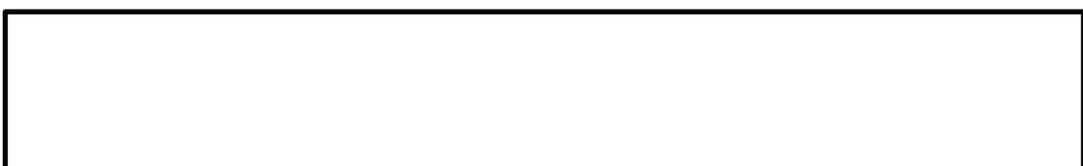
Zur quantitativen Dosisbestimmung mit Hilfe dieser cytogenetischen Indikatoren eignen sich besonders die Lymphocyten des peripheren Blutes. Ihre Entnahme und Kultivierung ist im Vergleich zu anderen Zellsystemen (z.B. Knochenmarkzellen) einfach, sie sind über den gesamten Körper verteilt und im Hinblick auf die Verteilung auf die Zellzyklus-Phasen stellen sie eine homogene Population dar (alle befinden sich in der  $G_0$  - Phase). Allerdings existieren langlebige Lymphocyten (Gedächtniszellen), die den cytogenetischen Schaden akkumulieren und für Jahrzehnte konservieren können. Dies haben die Untersuchungen an

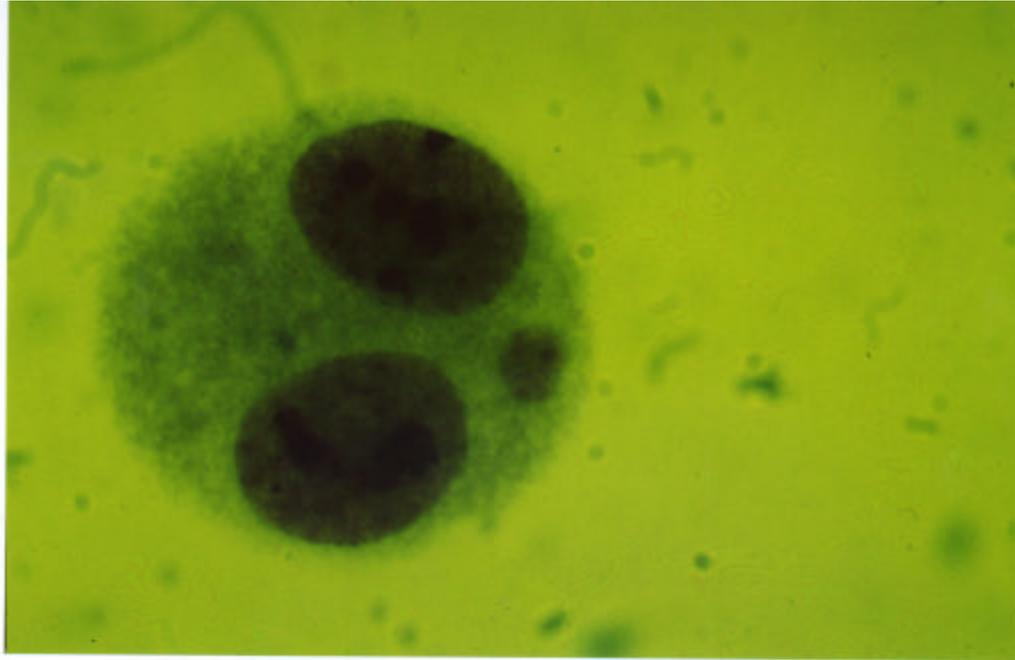
strahlenbehandelten Patienten (Buckton et al., 1983) und Atombomben-Überlebenden (Sasaki und Miyata, 1968) gezeigt.

Im Hinblick auf den Einsatz der Lymphocyten als Mikronukleustest-System sollte man die große Schwankungsbreite des Stimulierungserfolges durch Mitogene nicht übersehen.

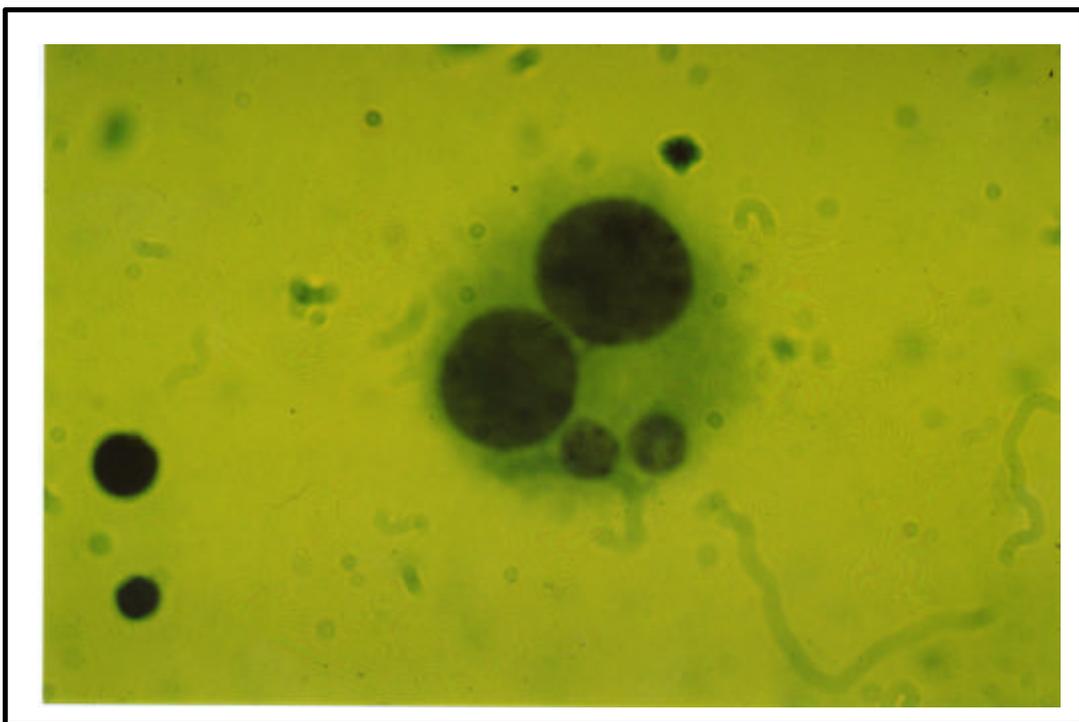


**Bild 2: Binukleärer Lymphocyt ohne Mikronukleus (Giemsa-Färbung, 1000 fache Vergrößerung)**





**Bild 3: Mikronukleus in einem binukleären Lymphocyt (Giemsa-Färbung, 1000 fache Vergrößerung)**



**Bild 4: Zwei Mikronuklei in einem binukleären Lymphocyt (Giemsa-Färbung, 1000 fache Vergrößerung)**

Fenech und Morley (1985 b) haben nach PHA-Stimulation eine interindividuelle Variabilität der Stimulierbarkeit mit Häufigkeiten zwischen 5-50% gefunden, auch intraindividuell

schwankt der Stimulierungserfolg. Lymphocyten stellen nicht nur funktionell, sondern ebenso hinsichtlich ihrer Strahlenempfindlichkeit und ihrer Proliferationskinetik eine aus mehreren Subpopulationen zusammengesetzte Zellpopulation dar (Högstedt et al., 1988a,b; Wuttke et al., 1993).

Zahlreiche Messungen haben gezeigt, daß man sowohl für die Bestimmung der dizentrischen Chromosomenaberrationen als auch für die der Mikronuklei gute Dosiswirkungsbeziehungen für die Abhängigkeit von der Strahlenqualität (Strahlenart und Strahlenenergie) von der Dosisleistung und anderen Faktoren erhält (Prosser et al., 1988; Litt lefield et al., 1989; Thierens et al., 1991; Verhaegen und Vral 1994). Der Mikronukleustest ist jedoch weniger spezifisch und auch weniger empfindlich als die Bestimmung dizentrischer Chromosomen. Die Untersuchungen der Mikronukleusraten in menschlichen Lymphocyten haben ergeben, daß nach in vitro und in vivo Bestrahlung keine unterschiedlichen Strahleneffekte beobachtet wurden. Damit können gute Vergleichswerte und Dosiswirkungsbeziehungen nach einer Bestrahlung der Lymphocyten in vitro ermittelt werden (Gantenberg et al., 1991; Wuttke et al., 1993). Es hat sich gezeigt, daß Strahlendosen im Bereich von etwa 0,5-5 Gy erfaßt werden können. Ein Nachteil des Mikronukleustestes liegt darin, daß man aufgrund der großen Variabilität der spontanen Mikronukleushäufigkeit, die niedrigen Strahlendosen (unter 0,5 Gy) schwer nachweisen kann.

### **1.2.2 Steigerung der Empfindlichkeit des Mikronukleustestes im niedrigen Dosisbereich**

Hinsichtlich der Steigerung der Strahlenempfindlichkeit des Mikronukleustestes gibt es einige Möglichkeiten, die in den letzten Jahren erprobt worden sind.

#### **1.3.1.1 Die Bestimmung der Mikronuklei ausschließlich in B-Lymphocyten**

Eine Verbesserung der biologischen Dosimetrie im niedrigen Dosisbereich stellt ein modifizierter Mikronukleustest dar, der die unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeiten der Lymphocyten-Subpopulationen nutzt (Wuttke et al., 1993). Im allgemeinen wurde beobachtet, daß sich B-Lymphocyten radiosensitiver verhalten als T-Lymphocyten, wobei unter T-Zellen eine hohe Strahlenempfindlichkeit für die T-Suppressor-Population festgestellt wurde (Prosser

et al., 1976, Stewart et al., 1988). Wuttke et al. (1993) haben in B-Zellen im Dosisbereich von 0,5-1 Gy hohe Mikronukleusfrequenzen ermittelt. Allerdings ist dafür eine Isolierung bzw. Identifizierung der Lymphocyten notwendig.

### **1.3.1.2 Unterscheidung zwischen Mikronuklei mit ganzen Chromosomen oder mit azentrischen Fragmenten**

Es ist bekannt, daß Mikronuklei sowohl azentrische Fragmente als auch ganze Chromosomen enthalten können. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß spontan entstehende Mikronuklei hauptsächlich aus ganzen Chromosomen bestehen, strahleninduzierte Mikronuklei dagegen vorwiegend auf azentrische Fragmente zurückzuführen sind (Weissenborn und Streffer, 1991; Vral et al., 1997). Einige Autoren unterschieden zwischen Mikronuklei mit ganzen Chromosomen und Mikronuklei mit azentrischen Fragmenten durch Messung der Größe der Mikronuklei (Yamamoto und Kikuchi, 1980; Högstädt und Karlsson, 1985), durch Messung des DNA-Gehaltes (Pincu et al., 1985; Vanderkerken et al., 1989). Durch den Einsatz der CREST-Antikörper gegen Kinetochore (Degrassi et al., 1988; Eastmond und Tucker, 1989, Fenech und Morley, 1989; Weissenborn und Streffer, 1991; Norppa et al., 1993) oder den Einsatz von DNA-Sonden gegen Centromere (Miller et al., 1992; Salassidis et al., 1992; Norppa et al., 1993; Vral et al., 1997) können strahleninduzierte Mikronuklei von den spontan entstandenen unterschieden werden. Die Empfindlichkeit des Mikronukleustestes kann auf diesem Wege gesteigert werden, weil der Nachweis der Mikronuklei strahlenspezifischer erfolgt und die Variabilität der spontanen Mikronuklei weitgehend eliminiert werden kann. Die letzten zwei Methoden haben größere Beachtung gefunden und sollen im folgenden näher beschrieben werden.

#### **1.3.1.2.1 Kinetochore**

Man hat schon früh erkannt, daß bei gewissen Autoimmunerkrankungen des Menschen mit großer Wahrscheinlichkeit Antikörper gegen Kernkomponenten auftreten. Dies wurde auch für diagnostische Zwecke herangezogen (zur Übersicht siehe Tan, 1989). Aus dem breiten Spektrum der gegen den Kern gerichteten Antikörper haben die Seren von CREST -Patienten für die Erkennung von Kinetochor-Proteinen große Bedeutung erlangt. Das CREST-Syndrom (Calcinosis, Raynauds's-Phänomenon, Esophageal Dysmotility, Sclerodactyly, Telangiectasia)

ist eine Sklerodermavariante, die durch krankhafte Vermehrung des Bindegewebes der Haut und anderer Organe gekennzeichnet ist. Ein hoher Prozentsatz von Seren aus CREST - Patienten, kurz CREST-Seren genannt, erkennt die Kinetochore in Mitosechromosomen und die Präkinetochore in Interphasechromosomen. Das Kinetochor bildet sich an dem als Centromer bekannten Abschnitt jedes Chromosoms. Kinetochore sind komplexe Strukturen aus Protein an einem mitotischen Chromosom, an welche die Spindelmikrotubuli binden. In der Literatur werden vorrangig drei Centromer -Proteine (CENP= **C**entromere **P**rotein) beschrieben, die man als CENP-A, -B, -C bezeichnet (Earnshaw und Rothfield, 1985).

#### **1.3.1.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit DNA-Sonden gegen Centromere**

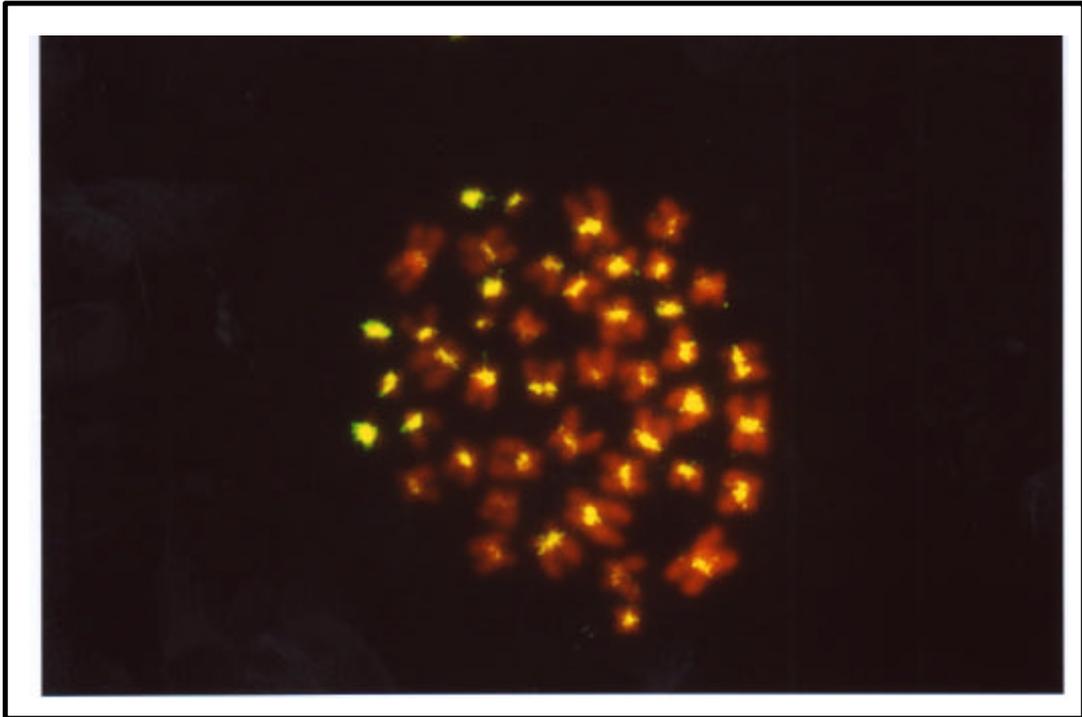
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine Methode, die die Möglichkeit bietet, Nucleinsäuresonden in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen sichtbar zu machen.

Als Centromer bezeichnet man eine zusammengezogene Region eines mitotischen Chromosoms, das die Schwesterchromatiden zusammenhält. Es ist auch ein Ort an der DNA, an dem sich das Kinetochor bildet (siehe 1.2.2.2.1)

Die Chromosomen des Menschen besitzen centromerständiges Heterochromatin. Als Heterochromatin bezeichnet man repetitive, transkriptionsinaktive DNA. Nach der Dichtegradientenzentrifugation von leicht gescherter DNA aus Säugerzellen erhält man neben einer Hauptbande eine oder mehrere Nebenbanden, die die hoch repetitiven Sequenzen enthalten und als Satellitenbanden bezeichnet werden (Willard, 1990). Die DNA aus den Centromeren menschlicher Chromosomen zeigt sich als Nebenbande, die  $\alpha$ -Satellit genannt wird. Der  $\alpha$ -Satellit, der etwa 5% des Genoms ausmacht, besteht aus tandemartig hintereinander angeordneten DNA -Sequenzen. In humanen Chromosomen sind in diesen Strukturen keine codierenden Sequenzen gefunden worden. Die Menge an  $\alpha$ -Satelliten-DNA pro Chromosom eines Individuums ist nicht konstant, sondern kann zwischen 300 und mehr als 5000 kb variieren. Auch sind Unterschiede zwischen gleichen Chromosomen in verschiedenen Individuen einer Population beobachtet worden. Die Konsensus-Sequenz der Monomere in den  $\alpha$ -Satelliten des Menschen ist 171 bp lang. Die Monomere in verschiedenen nicht homologen Chromosomen können sich in ihrer Sequenz um 15-30% unterscheiden. Mitchell et al. (1985) zeigten als Erste, daß die  $\alpha$ -Satelliten bei allen menschlichen Chromosomen in der Centromerregion vorkommen.

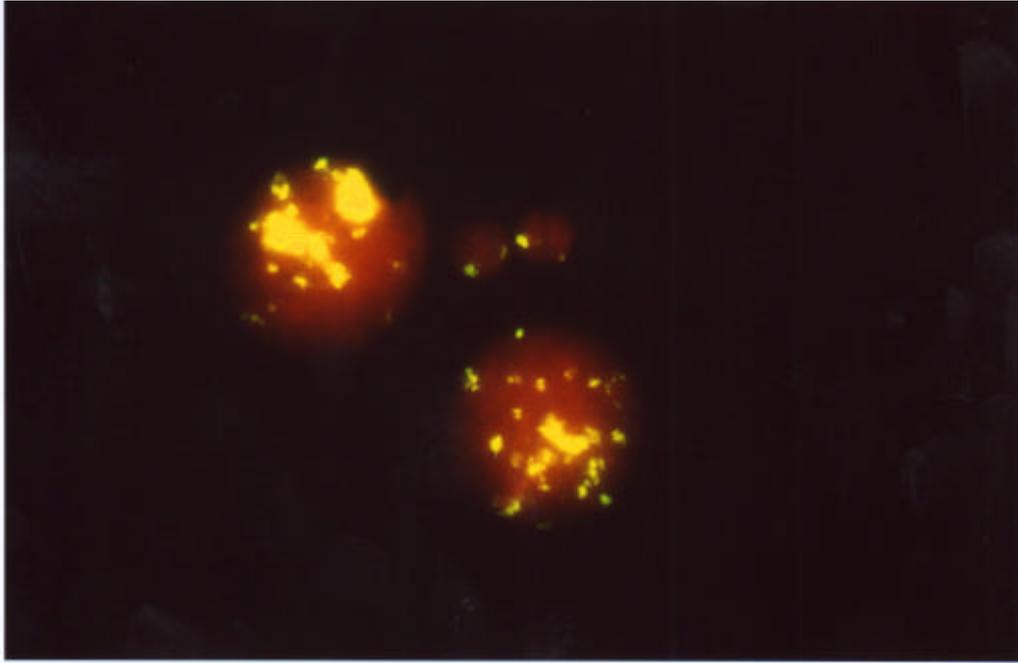
Um Centromere nachzuweisen, verwendet man Sonden, die aus  $\alpha$ -Sequenzen bestehen und die an die Centromerregion aller menschlichen Chromosomen binden (Bild 5).

Mikronuklei, die aus ganzen Chromosomen entstanden sind, weisen Centromer-Fluoreszenz-Signale auf (Bild 6) und Mikronuklei, die azentrische Fragmente enthalten, zeigen keine Fluoreszenz-Signale (Bild 7).

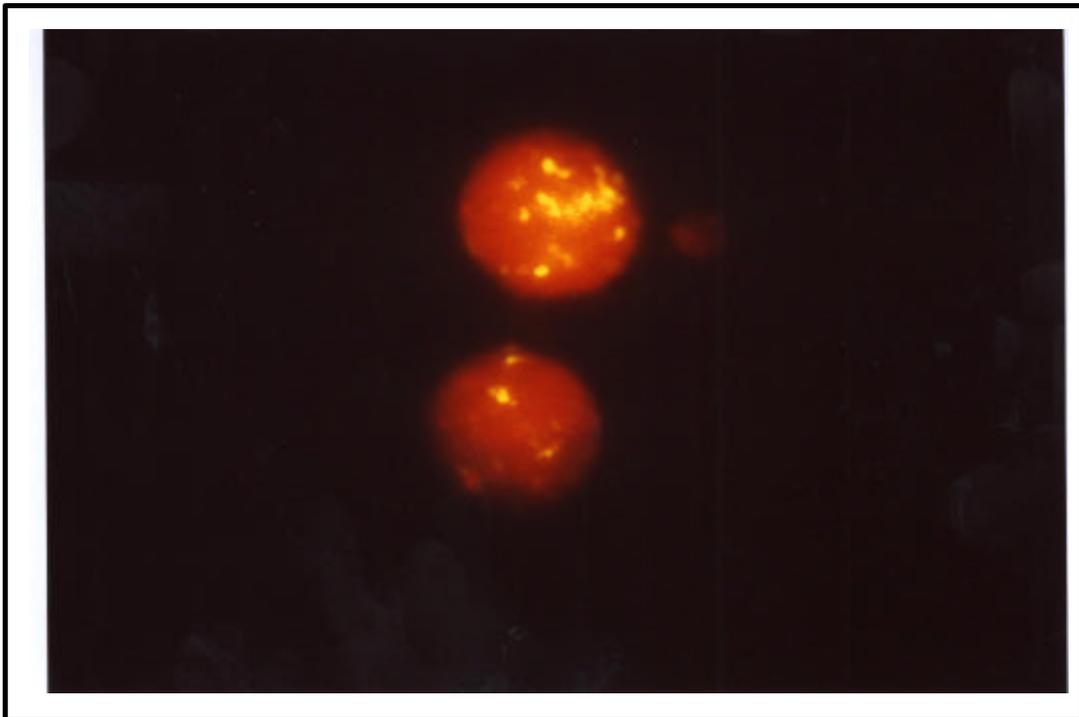


**Bild 5: Centromersignale in Chromosomen (FISH, 1000 fache Vergrößerung)**





**Bild 6: Binukleärer Lymphocyt mit 2 Mikronuklei mit jeweils 2 Centromersignalen (FISH, 1000 fache Vergrößerung)**



**Bild 7: Binukleärer Lymphocyt mit Mikronukleus ohne Centromersignal (FISH, 1000 fache Vergrößerung)**

### **1.3 Der Hintergrund der Untersuchungen am Blut von ehemaligen Wismut Arbeitern**

Verschiedene epidemiologische Untersuchungen an Bergarbeitern, vor allem an Uranbergarbeitern, haben ergeben, daß durch ionisierende Strahlung, die beim Zerfall von Radon und seinen radioaktiven Folgeprodukten entstanden ist, vermehrt Bronchialkarzinome auftreten. Es sind relativ gut übereinstimmende Risikofaktoren ermittelt worden (Lubin et al., 1995). Bei den Uranbergarbeitern der Wismut AG hat, vor allem in den Jahren 1946 bis 1955, aber auch in späteren Jahren eine sehr hohe Strahlenexpositionen stattgefunden. Diese Expositionen sind durch die Inhalation von Radon und seinen radioaktiven Folgeprodukten, die sich in erheblichem Ausmaß auf dem inhalierten Staub niederschlagen, entstanden. Bei diesen Arbeitern sind vermehrt Bronchialkarzinome aufgetreten.

Es ist seit längerem bekannt, daß Tumorzellen oft erhöhte Mikronukleus-Frequenzen aufweisen (Steffler et al., 1986). Es wird vermutet, daß genomische Instabilität in Tumorpatienten häufiger als bei gesunden Personen auftritt. Mit genomischer Instabilität wird die Beobachtung beschrieben, daß die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von DNA-Schäden deutlich ansteigt (für eine Übersicht s. Morgan et al., 1996). Von diesem Phänomen sind dann auch die Tumorzellen der Patienten betroffen, so daß über diesen Mechanismus die erhöhten Mikronukleus-Frequenzen in Tumorzellen verständlich werden.

### **1.3.1 Geschichte der Wismut AG**

Nach dem zweiten Weltkrieg im Jahre 1946 startete in der ehemaligen sowjetischen Besatzungszone in Ost-Deutschland die Uranproduktion. Es wurde eine sowjetisch-deutsche Aktiengesellschaft „Wismut“ gegründet. In den Jahren 1946 -1955 wurden bei der Wismut AG ca. 200 000 Arbeiter beschäftigt: 156 000 in Sachsen und 44 000 in Thüringen (Brüske-Hohlfeldt et al., 1997).

Bis 1956 waren Strahlenschutz und Arbeitsbedingungen mangelhaft. Trockenbohrungen führten zu sehr hohen Staubkonzentrationen und damit auch zu hohen eingeatmeten Radionuklid-Konzentrationen während der schweren körperlichen Arbeit. Erschwerend kam hinzu, daß eine künstliche Belüftung der Stollen fehlte. Nach 1956 haben sich die Arbeitsbedingungen etwas verbessert. Es wurden Naßbohrungen eingeführt, und die Radon-Konzentrationen wurden systematisch an ausgewählten Stellen gemessen. Erst ab 1971 wurden

die internationalen Normen für Uranbergwerke eingeführt, ein individueller Strahlenschutz wurde festgelegt, und es wurden jährliche Gesundheitskontrollen durchgeführt.

Die wichtigste Gesundheitsgefährdung bestand in der  $\alpha$ -Strahlung, die größtenteils von den Radon-Töchtern stammt. Das Element Radon 222 zerfällt mit einer Halbwertszeit von knapp vier Tagen in kurzlebige Tochterprodukte, wobei  $\alpha$ -Strahlen entstehen. Kurz nach ihrer Erzeugung reichern sie sich in der Luft an und werden beim Einatmen in den Atemwegen abgeschieden. Nach der Inhalation werden sie durch die Schleimhaut der Luftwege aufgenommen und zerfallen hier in mehreren Schritten weiter zum relativ stabilen Blei-210. Durch diesen Vorgang finden weitere Strahlenexpositionen statt:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Strahlung. Gerade in dem besonders empfindlichen Bereich der Lunge, dem Bronchialepithel, kam es zu sehr hohen Strahlendosen.

Radioaktive Kettenreaktion beim Zerfall des Uran-Isotops (U-238) nach Enderle und Friedrich (1995):

<u>Isotop</u>	<u>Halbwertszeit des Isotops</u>	<u>Aggregatzustand</u>
U-238	$4,5 \times 10^9$ Jahre	
↓		
↓		
↓		
Ra-226	1600 Jahre	
↓ $\alpha$ - Strahlung		
<b>Rn-222</b>	<b>3,82 Tage</b>	<b>Edelgas</b>
↓ $\alpha$ - Strahlung		
Po-218	3,05 min	Fest
↓ $\alpha$ - Strahlung		
Pb-214	26,8 min	Fest
↓ $\beta$ , $\gamma$ -Strahlung		
Bi-214	19,7 min	Fest
↓ $\beta$ , $\gamma$ -Strahlung		
Po-214	164 $\mu$ s	Fest
↓ $\alpha$ - Strahlung		
Pb-210	21 a	Fest
↓		

Zur Beschreibung der Strahlenexpositionen in Uranbergwerken der Wismut AG wurde die historische Einheit WLM (Working level month) benutzt. Zugrunde liegt der Definition das „Working level (WL)“ und bedeutet dieses die potentielle  $\alpha$ -Energie Konzentration der Radon-Töchter im Gleichgewicht mit 100 pCi/l oder 3700 Bq/m<sup>3</sup> Radon. 1 WL entspricht einer potentiellen  $\alpha$ -Energie Konzentration von  $1,3 \times 10^5$  MeV/l =  $2,08 \times 10^{-5}$  J/m<sup>3</sup>. Diese Expositionen wurden für einen Monat berechnet (170 Arbeitsstunden) und als WLM definiert. In Ost-Deutschland wurden 40 MeV/cm<sup>3</sup> potentielle  $\alpha$ -Energie Konzentration für Radon 222 Folgeprodukte für exponierte Personen in späteren Jahren (nach 1976) zugelassen. Dies entsprach einer Exposition von 4 WLM im Jahr (40 mSv/Jahr). Die Strahlenexpositionen betragen in früheren Jahren (zitiert in Strahlenexpositionen und strahleninduzierte Berufskrankheiten im Uranbergbau am Beispiel Wismut, 1993):

bis 1955	30 - 300 WLM/Jahr
1956-1960	10 - 100 WLM/Jahr
1961-1965	5 - 50 WLM/Jahr
1966-1970	3 - 25 WLM/Jahr
1971-1975	2 - 10 WLM/Jahr
von 1976	1 - 4 WLM/Jahr

Die Angaben der ersten 10 bis 15 Jahre sind nicht sehr genau, da noch keine Messungen der Strahlenexpositionen durchgeführt wurden, diese Werte sind nachträglich berechnet worden.

Im Jahre 1990 sind die Uranbergwerke der Wismut AG geschlossen worden. Man spricht von ungefähr 9000 Lungenkarzinom-Fällen, davon wurden 5276 Fälle als Berufskrankheit anerkannt (Brüske-Hohlfeldt et al., 1997).

Da bei den Arbeitern der Wismut AG weitere gesundheitliche Schäden zu erwarten sind, ist es von Interesse zu überprüfen, ob die hohen Strahlenexpositionen zu Schädigungen geführt haben. Diese Schäden sollen durch experimentelle Untersuchungen frühzeitig erfaßt und die Ergebnisse möglicherweise als prognostische Maßstäbe verwendet werden.

#### **1.4 Aufgabe der vorliegenden Arbeit**

Gegenstand dieser Arbeit war die Überprüfung und Verbesserung der Einsetzbarkeit des Mikronukleustestes in der biologischen Dosimetrie. Als Schwerpunkt wurde die Möglichkeit der Verwendung des Testes im niedrigen Dosisbereich (unterhalb 0,5 Gy) festgelegt. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob man die Empfindlichkeit des Mikronukleustestes steigern kann, indem man die strahleninduzierten von den "spontan" entstandenen Mikronuklei mit Hilfe von DNA-Sonden gegen Centromere unterscheidet.

Es sollte ferner überprüft werden, ob man frühere berufliche Strahlenexpositionen der Wismut-Arbeiter mit dem Mikronukleustest unter Verwendung der Cyt.B-Technik erfassen kann. Da lediglich mit geringen Veränderungen der Mikronukleus-Häufigkeiten zu rechnen war, sollte außerdem die oben erwähnte Centromer-Methode eingesetzt werden. Hierzu sollten Kalibrierkurven nach Bestrahlung von Lymphocyten gesunder Spender erstellt werden, damit eine Dosis-Abschätzung für die Wismut-Arbeiter durchgeführt werden konnte.

Eine ergänzende Analyse von Chromosomenaberrationen sollte angewendet werden, um eine bessere Charakterisierung der Aberrationen zu erhalten, die zu Mikronuklei führen. Von der Etablierung des Mikronukleustestes erhofft man sich eine Alternative bzw. Ergänzung zu den traditionellen Metaphase-Chromosomen-Untersuchungen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Probanden

Es wurde Blut von 9 gesunden Spendern untersucht:

Spender 1 (G1): weiblich, 30 Jahre alt (Nichtraucher)

Spender 2 (G2): weiblich, 31 Jahre alt (Raucher)

Spender 3 (G3): männlich, 48 Jahre alt (Nichtraucher)

Spender 4 (G4): männlich, 63 Jahre alt (Nichtraucher)

Spender 5 (G5): männlich, 50 Jahre alt (Nichtraucher)

Spender 6 (G6): männlich, 57 Jahre alt (Nichtraucher)

Spender 7 (G7): männlich, 73 Jahre alt (Nichtraucher)

Spender 8 (G8): männlich, 60 Jahre alt (Nichtraucher)

Spender 9 (G9): männlich, 57 Jahre alt (Raucher)

Insgesamt wurden Tests mit Blut von 40 Wismut-Arbeitern durchgeführt:

14 Wismut-Arbeiter ohne Tumor (W):

Alle Probanden waren männlich, zwischen 59 und 71 Jahre alt

und 55 Wismut-Arbeiter mit Bronchialkarzinom (WT+WTS):

Alle Probanden waren männlich, zwischen 61 und 76 Jahre alt

Folgende Spender erhielten eine Strahlentherapie (WTS); die Angaben zu den Strahlendosen und Bestrahlungsorten sind aus den Informationsblättern entnommen worden:

WTS 2: 14.11-19.12.1995- Radiatio der Schädel 40 Gy, der Lunge 50 Gy

WTS 5: bis 06.1996-Radiatio des Mediastinums 56 Gy, Supraclavikulargrube 46 Gy

WTS 8: Erste Strahlentherapie im September 1994, wegen Rezidivs nochmalige in 1996

WTS 14: 02.1995- Radiatio mit einer Gesamtdosis von 40 Gy

WTS 15: Mai bis November 1992- Schädelbestrahlung 30 Gy

WTS 17: 06.02-17.02.1985-Gesamtherddosis-50 Gy

WTS 28: Mai-Juni.1995-Herddosis von 33 Gy

WTS 31: Frühjahr 1997, 66 Gy

WTS 35:Telekobaltbestrahlung 1996 (bei Skelettmetastasierung); Chemotherapie 1995

WTS 37: 1994, 23 Bestrahlungseinheiten

WTS 52: bis 02.1997 Radiatio des Mediastinums45 Gy, Kopfes-30 Gy und  
Chemotherapie- 5 Zyklen

WTS 56: 12.97 bis 02.98- Radiatio der Tumorregion von mit 56 Gy

WTS 64: 1990 Bestrahlung der linken Lunge

WTS 65: 07.1997-09.1997, Herddosis 48 Gy.

## **2.1.2 Puffer, Lösungen und Reagenzien**

### **2.1.2.1 Reagenzien und Lösungen zur Lymphocyten Kultur**

#### RPMI 1640 Medium

Gibco, Kat. Nr.-52400-025

Dieses Grundmedium wurde als Flüssigmedium bezogen. Vor Gebrauch wurden jeweils zu 400 ml Medium folgende Substanzen bzw. Lösungen hinzugefügt:

#### 100 ml Fötales Kälberserum (FKS)

Gibco, Kat. Nr.-011-06290 M

#### 6 ml Antibiotic-Antimycotic Lösung

Gibco, Kat. Nr.-15240-039

#### 4 ml L-Glutamin-Lösung

Merck, Kat. Nr.-1.00289.0025

0,3 g L-Glutamin in 10 ml Aqua dest. lösen und sterilfiltrieren

#### 10 ml PHA-Lösung (siehe 2.1.2.2.)

Um die Stabilität der zugesetzten Substanzen zu gewährleisten, wurde das Medium a' 10 ml portioniert und bei -20°C eingefroren.

### **2.1.2.2 Reagenzien zur Lymphocyten-Stimulation**

#### Phytohämagglutinin (PHA)

Gibco, Kat. Nr.-10576-015

gelöst in 10 ml Aqua bidest., sterilfiltriert

### **2.1.2.3. Reagenzien für den Mikronukleustest**

#### Cytochalasin B aus *Helminthosporium damatioideum*, kristallin;

Sigma, Kat.Nr.-C-6762

10 mg Cytochalasin B ad 10ml DMSO; 50µl-Aliquot portionieren und lagern (-20°C)

#### Dimethylsulfoxid (DMSO)

Serva, Kat.Nr.-20385

#### KCl-Lösung- 0,125 M oder 0,14 M in Aqua bidest.

Riedel-de Haen, Best.Nr.-12636

#### NaCl-Lösung -0.9 % in Aqua bidest.

Sigma, Best.Nr.-S-3014

#### Essigsäure 96 % z. A.

Baker, Best.Nr.-605

#### Ethanol 99,9 % z.A

Baker, Best.Nr.-8006

#### Phosphat-Pufferlösung pH 6,88

0,075 M Kalium Phosphat

Merck, Kat.Nr.-7294

#### **2.1.2.4 Reagenzien für den Mikronukleustest mit FISH-Technik**

##### DNA-Centromer Sonden gegen alle menschlichen Chromosomen:

\* All Human Centromers Probe (mit Biotin markiert)

Oncor, Best.Nr. -P5095-B.5

\* All Human Centromers Probe (mit Digoxigenin markiert)

Oncor, Best.Nr. -P5059-DG.5

##### Antikörper für Biotin markierte DNA-Centromer Sonden

\* Avidin , FITC markiert

Vector, Best.Nr. A-2001

\* Goat-Anti-Avidin

Vector, Best.Nr. BA-0300

##### Antikörper für Digoxigenin markierte DNA-Centromer Sonde:

\* Mouse-anti-digoxigenin

Sigma, Best.Nr. D-8156

\* Sheep-anti-mouse, Digoxigenin markiert

Boehringer, Best.Nr. 1214624

\* Sheep-anti-digoxigenin, FITC markiert

Boehringer, Best.Nr. 1207741

##### 20×SSC-, Saline Natrium-Zitrat“-Puffer Konzentrat

20×konzentrierte Lösung (0,3 M Na-Zitrat, pH 7; 3 M NaCl):

in 800 ml Aqua bidest:

175,3 g NaCl, Sigma, Best.Nr.-S-3014

88,24 g Na-Zitrat, Sigma, Best.Nr.-C-8532, mit HCl oder NaOH pH auf 7 einstellen, dann mit Aqua bidest. auf 1L auffüllen, autoklavieren.

#### 2×SSC

100 ml 20×SSC mit 850 ml Aqua bidest. gut durchmischen. Den pHWert mit HCl oder NaOH auf 7 einstellen, dann Mit Aqua bidest auf 1 L auffüllen, autoklavieren.

#### RNaseA

Boehringer, Best.Nr.-109 142

100 µg in 1 ml 2×SSC lösen; in 150 µl Aliquot portionieren und bei-20°C lagern

#### Pepsin

Sigma, Best.Nr.-P 6878

1g in 10ml Aqua bidest., in 50 µl Aliquot portionieren und bei-20°C lagern

#### Formaldehyd-Lösung 37 %

Merck, Best.Nr.-4000

#### Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

12 mM Natriumchlorid

2,7 mM Kaliumchlorid

10 mM Phosphat Puffer Salzen, pH 7,4

Seromed, Best.Nr.-L-182-10

#### PBS+50 mM MgCl<sub>2</sub>

1,0166 g MgCl<sub>2</sub> pro 100 ml PBS

#### Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)

Merck, Best.Nr.-5833

#### Formamid

Merck, Best.Nr.- 12027

Formamid-Denaturierungslösung (90% Formamid):

45 ml Formamid

5 ml 20×SSC, mit HCl pH 7 einstellen, immer unmittelbar vom Gebrauch ansetzen.

Formamid-Waschlösung (50% Formamid in 2×SSC):

100 ml Formamid

20 ml 2×SSC

80 ml Aqua bidest., mit HCl pH7 einstellen, immer unmittelbar vom Gebrauch ansetzen.

Ampuwa für Spülzwecke

Fresenius, Best.Nr.-8010

Mastermix:

10 ml Formamid

2g Dextran sulfat, Pharmacia, Best.Nr.-17-0340-01

2 ml 20×SSC, einige Stunden in einem Glas bei 70 °C im Wasserbad vorwärmen, dann mit Aqua bidest. auf 14 ml auffüllen, pH 7 mit HCl einstellen, steril filtrieren durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße, lagern bei -20 °C

4T-Puffer (4×SSC/ 0,05% Tween 20, 100ml)

20 ml 20×SSC

50 µl Tween 20 , Sigma, Best.Nr.-P-1379

80 ml Aqua bidest., steril filtrieren

4M-Puffer (4×SSC/ 5% Magermilchpulver, 100ml)

20g 20×SSC

5g Magermilchpulver (Non-fatty milk, Sigma, Best.Nr.-M 7409)

auf 100 g auffüllen mit Aqua bidest., durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße steril filtrieren.

DABCO (1, 4-Diazabicyclo[2,2,2]octan)

Sigma, Best.Nr.-D 2522

Gebrauchslösung:

0,233 g DABCO

800µl Aqua bidest.(Ampuwa)

200 µl 1 M Tris-HCl, Sigma, Best.Nr.-T 3253, pH 8

9 ml Glycerol, Sigma, Best.Nr.-6279

gut zusammenmischen, lagern im Dunkeln bei 4°C .

**2.1.2.5 Reagenzien für die Untersuchung von Chromosomenaberrationen**BrdU (5-Bromo-2-deoxy-Uridin)

Serva, Best.Nr. 15240

Gebrauchslösung:

0,0031g BrdU in 10 ml PBS lösen, steril filtrieren.

Behälter mit Alufolie umwickeln (Lichtschutz), bei 4°C aufbewahren

Colcemid(10µg /1ml)

10 µg Colcemid in 1 ml PBS gepufferter Salzlösung

Gibco, Best.Nr. 15210-040

lagern bei 4°C.

Bisbenzimid-Lösung,

Sigma, Best.Nr. B 2883

Bisbenzimid Stocklösung: 0,5 g / 100 ml Aqua bidest., im Dunkeln lagern

Bisbenzimid Gebrauchslösung: 1ml Stock / 100 ml Aqua bidest.

PBS (siehe 2.1.2.4)

### **2.2.6.5 Reagenzien für DNA-Färbung**

#### Giemsa-Lösung

Best.Nr.-9204

10% Giemsa-Lösung in Phosphatpuffer pH 6,88

5% Giemsa-Lösung in Phosphatpuffer pH 6,88

#### Propidiumiodid (PI)

Serva, Best.Nr.-33671

Stammlösung: 1mg PI in 10 ml PBS

Stocklösung: 1 µl der Stammlösung in 100 µl DABCO

Gebrauchslösung: 40 µl der Stocklösung in 1000 µl DABCO

### **2.1.3 Geräte**

#### Brutschrank

Begasungsbrutschrank, Heraeus, Hanau

#### pH /°C- Meßgerät

Hanna instruments, Mikroprozessor, pH/°C Meßgerät, HI 9024

#### Zentrifugen

Labofuge<sup>®</sup> GL, Heraeus Christ; Sigma, 4-10 Nr. 10852

Mikrozentrifuge, Carl ROTH<sup>®</sup> GmbH, Best.Nr.-9013.1

#### Heizplatte

Gerät Typ 12801, MEDAX Nagel GmbH, Kiel

#### Bestrahlungseinheit

Bestrahlungskontrolleinheit, Stabilipan, Siemens, 15 mA, 240 kV, 0,5 mm Cu

Röntgenröhre, Siemens, Typ TR 300f; Eigenfilterung 0,5 mm Cu

Röhrengehäuse, Siemens, Typ: 250

Dosimeter, Physikalisch-technische Werkstätten (PTW), Freiburg, Typ: PTW- SN4

#### Mikroskope

Lichtmikroskop, Ernst Leitz GmbH, Typ: SM-LUX

Fluoreszenzmikroskop, Ernst Leitz GmbH, Typ Diaplan 020-437.035, mit Kamerasystem für die automatische Mikrophotographie, Leitz Vario Orthomat 2

Alle hier nicht aufgeführten Geräte entsprechen den üblichen Laborstandards.

### **2.1.4 Glaswaren**

#### Objektträger

76 x 26 mm, Artikel-Nr. 021102, Menzel-Gläser

#### Deckgläser

24 x 48 mm, Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Erdmünde

24 x 60 mm, Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Erdmünde

#### Zentrifugengläser

mit konischem Spitzboden, ungraduiert, ca. 98 x 17 mm, Nr. 946/1, Assistent

#### Färbeküvetten: Coplin Jar mit Deckel

Assistent, Best.Nr.-2470

#### Gewindeflaschen

100 ml, Duran, Best. Nr.-2180124

500 ml, Duran, Best.Nr.- 2180124

### **2.1.5 Plastikwaren**

Eppendorf Reaktionsgefäße, Sarstedt, Best.Nr. -72.690,

1,5 ml, 39 x 10mmØ

Eppendorf Reaktionsgefäße , Sarstedt, Best. Nr. -72.699

0,5 ml, 30 x 7,8 mmØ

Monovette zur Blutgewinnung

Sarstedt, Best.Nr. -02.1064

9 ml S-Monovette<sup>®</sup>AH, versetzt mit 15 I.E. Ammonium-Heparin / ml Blut, 92 x 16,5 mm

Plastikwaren der Firma Falcon:

\* Serologische Pipetten: 5 ml-Best.Nr.-7543

10 ml-Best.Nr.-7551

25 ml-Best.Nr.-7525

\* Zentrifugenröhrchen 15 ml, Best.Nr.-2099

\* Gewebekulturflaschen 25 cm<sup>2</sup>, Best.Nr.-3013E

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Bestrahlung**

Die Bestrahlung der Blutzellen erfolgte in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (siehe 2.1.5 Plastikwaren) mit Hilfe eines Stabilipan-Röntgen-Gerätes der Firma Siemens (siehe 2.1.3 Geräte, Bestrahlungseinheit) mit einer Dosisleistung von 1 Gy/min.

Die Dosis wurde mit einem Dosimeter der Firma PTW gemessen (siehe 2.1.3 Geräte)

Das Blut von gesunden Spendern wurde mit folgenden Dosen bestrahlt:

0,10; 0,30; 0,50; 1,00; 1,25; 2,00 und 2,50 Gy.

### **2.2.2 Vollblut-Kulturen für den Mikronukleustest und die Chromosomenaberrationenbestimmung**

0,5 ml von dem heparinisierten Venenblut (siehe 2.1.5 Plastikwaren, Monovette zur Blutgewinnung) wurde zu 4,5 ml Medium (siehe 2.1.2.1 Reagenzien und Lösungen für Lymphocyten Kultur) in kleinen Kulturflaschen suspendiert und mit PHA (siehe 2.1.2.2) stimuliert.

Die Kulturen wurden sowohl für den Mikronukleustest als auch für die Chromosomenaberrationenauswertung bei 37°C / 5% CO<sub>2</sub> / 95 % Luft (Begasungsbrutschrank, siehe 2.1.3 Geräte) inkubiert.

## **2.2.3 Nachweis von Mikronuklei in binukleären Lymphocyten**

### **2.2.3.1 Cytochalasin B-Zugabe**

44 h nach Bestrahlung und Kulturbeginn erfolgte die Zugabe von Cytochalasin B (nach dem Standardprotokoll von Fenech und Morley, 1985 a, b).

### **2.2.3.2 KCl- Behandlung**

24-26h nach der Cytochalasin B-Zugabe wurden die Lymphocytenkulturen in Glaszentrifugenröhrchen (siehe 2.1.4 Glaswaren) in der Zentrifuge (Labofuge<sup>®</sup> GL, siehe 2.1.3 Geräte) bei 1000 U/min 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 0,5 ml abgesaugt. Dem Pellet wurde unter langsamem, ständigem, sanftem Mischen mit einer Pasteurpipette 10 ml KCl Lösung zugefügt. Der optimale Grad der Hypotonie der KCl-Lösung, der eine ausreichende Schwellung der Zellen bewirkte, das Cytoplasma aber erhielt, änderte sich zeitweise und lag im Bereich zwischen 0,125 M bis 0,14 M. Dies mußte gegebenenfalls neu ausgetestet werden.

Die Zellen wurden 6 min in KCl-Lösung bei Zimmertemperatur inkubiert und dann wieder abzentrifugiert.

### **2.2.3.3 Fixierung der Lymphocyten**

Nach der KCl-Behandlung wurden die Zellen vorsichtig in frisch hergestelltem Fixativ I (nach Wuttke et al., 1993, Methanol: NaCl: Essigsäure = 4,8: 5,2: 1; erst kurz vor Gebrauch mischen) aufgenommen und sofort zentrifugiert.

Dann folgte der nächste Waschvorgang mit einem frisch angesetzten Fixativ II (Methanol: Essigsäure= 4,8: 1). Dieser wurde so oft wiederholt, bis der Überstand klar erschien. Der Überstand wurde dann vorsichtig bis auf 0,5 ml abdekantiert und die Lymphocyten in dem verbleibenden Fixativ resuspendiert. Die Zellen wurden auf in Ethanol entfettete Objektträger (siehe 2.1.4 Glaswaren) mit der Pasteurpipette aufgetropft. Das auf dem Objektträger überstehende Fixativ wurde, um das Cytoplasma der Zellen zu erhalten, schnell abgekippt.

#### **2.2.4 Färbung und Auswertung der Mikronuklei beim Mikronukleustest**

Die trockenen Präparate (mindestens 24 h an der Luft getrocknet) wurden mit Giemsa-Lösung (siehe 2.1.2.6 Reagenzien für DNA-Färbung) gefärbt. In den gefärbten Präparaten wurden die Mikronuklei unter 500 facher Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop (siehe 2.1.3 Geräte) ausgewertet.

Es wurde angestrebt, 1000 binukleäre Lymphocyten pro Probe auszuzählen.

#### **2.2.5 Färbung und Auswertung von Mikronuklei beim Mikronukleustest mit FISH-Technik**

Nach der Fixierung der Lymphocyten (siehe 2.2.3.3) wurden die getrockneten Präparate bei -20 °C in trockenen Behältnissen (schwarze Präparateaufbewahrungskästen) gelagert, bis die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durchgeführt wurde. In Abhängigkeit von den verwendeten DNA-Sonden darf man die Präparate von 4 Wochen bis zu einem halben Jahr lagern, ohne daß die Qualität der hybridisierten Präparate beeinträchtigt wird.

##### **2.2.5.1 Vorbehandlungen der Objektträger für FISH-Technik**

Vor der in-situ-Hybridisierung wurden die Proben folgenden Vorbehandlungen (2.2.5.1.1-2.2.5.1.3) unterzogen, um die Signalspezifität zu erhöhen.

###### **2.2.5.1.1 RNaseA-Behandlung**

Beim Nachweis von DNA-Sequenzen entfernt man gewöhnlich die RNA im Cytoplasma und Kern durch die Inkubation der Präparate mit RNaseA. Bei diesem Vorgang wird die einzelsträngige RNA abgebaut, damit die Sonde nicht mit RNA hybridisiert.

Auf jeden Objektträger wurden 125 µl RNaseA aufgetropft und die Objektträger wurden mit einem Deckglas abgedeckt. Dann folgte eine einstündige Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37°C.

Nach diesem Schritt wurden die Präparate in einer „Coplin Jar“ Küvette (siehe 2.1.4 Glaswaren) 3×5 min, bei Raumtemperatur mit 2×SSC gewaschen.

#### **2.2.5.1.2 Permeabilisierung mit Pepsin/HCl**

Um die Zellen für die Sonde und Nachweisreagenzien zugänglicher zu machen, behandelt man die Präparate mit proteinabbauenden Enzymen z.B.: Pronase E, Proteinase K oder Pepsin/HCl. Die Wirkung dieser Enzyme besteht darin, daß sie Nucleinsäuren von assoziierten Proteinen befreien.

Für 10 min (die Zeit kann sich bei neuer PepsinCharge ändern und muß daher immer neu getestet werden) wurden die Präparate in einer Färbeküvette mit der auf 37°C vorgewärmten Lösung (1M HCl, Aqua bidest. und Pepsin-Stocklösung, siehe 2.1.2.4 Reagenzien für den Mikronukleustest mit FISH-Technik) inkubiert. Dann wurden die Objektträger 2× je 5 min in PBS und 1× 5 min in PBS+MgCl<sub>2</sub> bei Raumtemperatur gewaschen.

#### **2.2.5.1.3 Postfixierung in 1% Formaldehyd**

Die Fixierung der Präparate konserviert die Gewebestruktur und begrenzt den weiteren Verlust von Nucleinsäuren. Die Behandlung der Objektträger mit 1% Formaldehyd führt zu einer Quervernetzung der Präparate. Dies dient zur Erhaltung der Struktur des Gewebes und der darin enthaltenen Nucleinsäuren.

In einer Färbeküvette wurden die Objektträger 10 min in 1% Formaldehyd-Lösung (siehe 2.1.2.4 Reagenzien für den Mikronukleustest mit FISH-Technik) inkubiert. Dann wurden die Präparate 1×5 min in PBS bei Raumtemperatur gewaschen, dehydriert in 70%, 90% und 2×100% Ethanol (jeweils 3 min) und an der Luft getrocknet.

### **2.2.5.2 Denaturierung**

Bei der in-situ-Hybridisierung müssen sowohl die Zielsequenzen als auch die Sonde zunächst denaturiert werden, damit beide als Einzelstränge vorliegen und miteinander hybridisieren können.

#### **2.2.5.2.1 Denaturierung der Zielsequenz**

Die Denaturierungslösung (siehe 2.1.2.4) wurde in einer Färbeküvette in einem Wasserbad auf 75°C vorgeheizt (Temperatur darf nicht unter 73°C sinken).

Um den Temperaturabfall der Denaturierungslösung zu verhindern, wurden die Objektträger auf die Wärmeplatte (50°C-60°C) gelegt.

Die vorgewärmten Präparate wurden 30 min in der Denaturierungslösung inkubiert.

Danach erfolgte eine rasche Entwässerung in -20°C kaltem 70%, 90%, 100%, 100% Ethanol, jeweils 2 min.

Dann werden die Objektträger an der Luft getrocknet und wieder mittels Heizplatte auf 42°C vorgewärmt.

#### **2.2.5.2.2 Denaturierung der Sonde**

Die Sonde wurde 5 min bei 37°C erwärmt, dann kurz zentrifugiert.

Es wurden jeweils 5µl Sonde pro Objektträger (Deckglas 24×48 mm) in den Eppendorfcup gegeben.

Die Sonde wurde 10 min bei 75 °C denaturiert, dann 20s im Eisbad abgekühlt und abzentrifugiert. Zu der Sonde wurden pro Objektträger 10µl Mastermix (siehe 2.1.2.4) zugegeben und gut vermischt.

#### **2.2.5.3 Hybridisierung**

Als die nachzuweisende Nukleinsäure und die Sonde einzelsträngig vorlagen, erfolgte die Hybridisierung.

Auf die vorgewärmten Objektträger (42 °C, siehe 2.2.5.2.1 Denaturierung der Zielsequenz) wurden 15µl Hybridisierungsgemisch (5µl Sonde + 10µl Mastermix) aufgetragen, mit einem Deckglas (24×48 mm) bedeckt und mit dem Fotokleber „rubber cement“ abgedichtet.

Danach erfolgte über Nacht eine Inkubation bei 37 °C (Brutschrank) in einer feuchten, dunklen Kammer .

#### **2.2.5.4 Waschen nach der Hybridisierung**

Die Waschschritte nach der Hybridisierung erfolgten unter stringenten Bedingungen, damit locker gebundene Sonden entfernt werden und korrekt gepaarte Hybridmoleküle übrig bleiben.

Das Deckglas wurde vorsichtig von den Präparaten entfernt und die Objektträger zuerst 3×5 min in einer warmen (37°C) FormamidWaschlösung (siehe 2.1.2.4) und danach ebenfalls bei 37 °C für 3×5 min in 2×SSC gewaschen.

#### **2.2.5.5 Nachweis der Hybridisierungsstellen**

Im Anschluß an die Hybridisierung der Sonde und an die stringenten Waschschritte wurden die Positionen im Präparat nachgewiesen, mit denen die Sonde hybridisiert hat (DNA Centromersequenzen von allen menschlichen Chromosomen). Die Methoden zum Nachweis und zur Visualisierung der Signale richtete sich nach der Art der Markierung der Sonde.

##### **2.2.5.5.1 Nachweis von biotin-und digoxigeninmarkierten Centromer-Sonden**

\* Waschen der Präparate 5 min mit jeweils 1000µl 4TPuffer (siehe 2.1.2.4)

Der restliche Puffer wird von Objektträgern abgekippt.

##### **1. Inkubation**

\* Vorinkubation 5 min mit 100µl 4MPuffer (siehe 2.1.2.4) pro Objektträger. Die Objektträger wurden während der Inkubation mit Parafilm abgedeckt.

\* Waschen mit 4T- Puffer (kurz)

- \* 30 min Inkubation mit 100µl Avidin<sup>FITC</sup> bzw. Mouse-anti-dig (siehe 2.1.2.4) pro Objektträger im Dunkeln in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C. Die Objektträger wurden während der Inkubation mit Parafilm abgedeckt.
- \* Nach der Entfernung vom Parafilm wurden die Objektträger 3×5 min mit jeweils 500µl 4T-Puffer gewaschen.

## 2. Inkubation

- \* Vorinkubation 5 min mit 100µl 4MPuffer pro Objektträger. Die Objektträger wurden während der Inkubation mit Parafilm abgedeckt.
- \* Waschen mit 4T-Puffer (kurz)
- \* 30 min Inkubation mit 100µl Goat-anti-Avidin bzw. Sheep-anti-mouse<sup>dig</sup> (siehe 2.1.2.4) pro Objektträger im Dunkeln in einer feuchten Kammer bei 37°C (Brutschrank). Die Objektträger wurden während der Inkubation mit Parafilm abgedeckt.
- \* Nach der Entfernung des Parafilms wurden die Objektträger 3×5 min mit jeweils 500µl 4T-Puffer gewaschen.

## 3. Inkubation

- \* Vorinkubation 5 min mit 100µl 4MPuffer pro Objektträger. Die Objektträger wurden während der Inkubation mit Parafilm abgedeckt.
- \* Waschen mit 4T-Puffer (kurz)
- \* 30 min Inkubation mit 100µl Avidin<sup>-FITC</sup> bzw. Sheep-anti-mouse<sup>-FITC</sup> pro Objektträger im Dunkeln in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C. Die Objektträger wurden während der Inkubation mit Parafilm abgedeckt.
- \* Nach der Entfernung vom Parafilm wurden die Objektträger 3×5 min mit jeweils 500µl 4T-Puffer gewaschen.

### 2.2.5.6 Gegenfärbung

Es wurden 40µl PI mit DABCO (siehe 2.1.2.4) pro Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas (24×48 mm) zugedeckt. Falls die Auswertung der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop (siehe 2.1.3 Geräte) nicht sofort erfolgt, wurden sie im Dunkeln, bei 4°C (Kühlschrank) bis zur Auswertung gelagert.

### **2.2.5.7 Auswertung von hybridisierten Präparaten**

Es wurde angestrebt, bei niedrigen Dosen (bis 0,5 Gy) 100 Mikronuklei und bei den höheren Dosen bis zu 1000 Mikronuklei pro Probe auf den Centromergehalt zu untersuchen. Es wurde auch die Anzahl von Fluoreszenzsignalen pro Mikronukleus bestimmt.

Die Auswertung erfolgte mit einem Diaplan-Fluoreszenzmikroskop (siehe 2.1.3 Geräte) unter 1000 facher Vergrößerung.

### **2.2.6 Nachweis von Chromosomenaberrationen**

#### **2.2.6.1 Colcemid-Zugabe**

3-4 Stunden vor der Zellernte erfolgte die Zugabe von Colcemid in einer Konzentration von 0,4µg/5ml PHA-stimulierter Kultur.

#### **2.2.6.5 KCl-Behandlung**

52 h bzw. 72 h nach Kulturbeginn wurde die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchenumgefüllt. Dann wurden die Zellen für 10 min bei 1000 U/min zentrifugiert und der Überstand bis auf etwa 0,5 ml abgesaugt. Die Zellen wurden langsam unter ständigem, sanftem Mischen mit einer Pasteurpipette in 10 ml warmer (37°C) 0,075 M KCl resuspendiert. Die Zellen wurden 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, dann 10 min bei 1000 U/min abzentrifugiert.

#### **2.2.6.3 Fixierung der Zellen auf den Objektträgern**

Nach der KCl-Behandlung wurde der Überstand abgesaugt und jedem Röhrchen unter ständigem, sanftem Mischen 8 ml Fixativ (Methanol:Essigsäure, 3:1) zugefügt.

Die Zellen wurden 10 min bei 1000 U/min abzentrifugiert. Die Behandlung mit dem Fixativ wurde so oft wiederholt, bis der Überstand klar erschien. Der Überstand wurde dann bis auf etwa 0,5 ml dekantiert und die Zellen aus möglichst hohem Abstand auf vorbereitete Objektträger getropft: Diese waren in Ethanol entfettet und in destilliertem Wasser ca. 8 Stunden bei 4°C aufbewahrt worden.

#### **2.2.6.4 FPG-Färbung (Fluorescence plus Giemsa)**

Die FPG-Färbung wird angewendet, um die Zellen in der 1. Mitose von denen in späteren Mitosen zu unterscheiden.

20 Stunden nach Kulturbeginn wurde den Zellen die BrdU-Lösung (siehe 2.1.2.5 Reagenzien für die Untersuchung von Chromosomenaberrationen) hinzugefügt.

Die hergestellten Präparate (siehe 2.2.6.3) wurden mindestens 3 Tage bei Zimmertemperatur getrocknet. Dann erfolgte die FPG-Färbung:

Die UV Lampe (360 nm Licht) wurde eingeschaltet und über die Heizplatte gehängt (Abstand zur Heizplatte etwa 20 cm), Heizplatte wurde auf 50-60°C vorgewärmt.

Die Präparate wurden für 20-30 min in Bisbenzimidlösung (siehe 2.1.2.5) ins Dunkle gestellt, dann kurz mit Aqua dest. gewaschen. Danach wurde jeder Objektträger in PBS (siehe 2.1.2.5) eingetaucht und mit einem sauberen Deckglas (24x60 mm) zugedeckt, dann auf die Heizplatte gelegt und 15-20 min mit UV Licht bestrahlt. Die Präparate wurden mit Aqua dest. kurz gewaschen und mit 5% Giemsa gefärbt (siehe 2.1.2.6 Reagenzien für DNA-Färbung).

#### **2.2.6.5 Auswertung von Chromosomenaberrationen**

100 Zellen in der 1. Mitose wurden auf das Vorkommen von Chromosomenaberrationen (Dizentrische Chromosomen, Chromosomen-Brüche, Chromatid-Brüche, Ring-Chromosomen) untersucht. Es wurde auch der Mitose-Index (Verhältnis der Zellen in der Mitose zu anderen, sich nicht teilenden Zellen) und der Anteil der Zellen in der 1. Mitose zu den Zellen in der 2. Mitose bestimmt.

#### **2.2.7 Statistik**

Für die statistischen Berechnungen wurde die Poisson-Verteilung für Mikronuklei vorausgesetzt.

Die Statistik wurde mit Hilfe des Students t-Tests und Fishers' Exact Test durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Proliferation der Lymphocyten nach in vitro Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Eine Vorbedingung für die Mikronukleus-Expression ist die Zellkernteilung. Die Zugabe von Cytochalasin B ist nur sinnvoll, wenn sich die Zellen in einer aktiven Wachstumsphase befinden. Nach dem Standardprotokoll für den Mikronukleus-Assay (Fenech und Morley, 1985 a,b) wird Cytochalasin B 44 Stunden nach Beginn der Kultur hinzugegeben. Die Proliferationsrate der Lymphocyten wurde überprüft, um das Ausmaß der Zellproliferation zu bestimmen und zu beurteilen, ob ein wesentliches Abweichen der Mikronukleusfrequenz eventuell auf eine Veränderung der Binukleationsrate zurückzuführen ist.

##### 3.1.1 Proliferationsrate in unbestrahlten Lymphocyten

Die Proliferationsrate in unbestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender betrug im Mittelwert 28,3%. Die individuellen Werte wurden in der Abbildung 1 zusammengestellt. Der niedrigste Wert wurde beim Spender G8 (22,1%) und der höchste beim Spender G2 (36,9%) beobachtet.

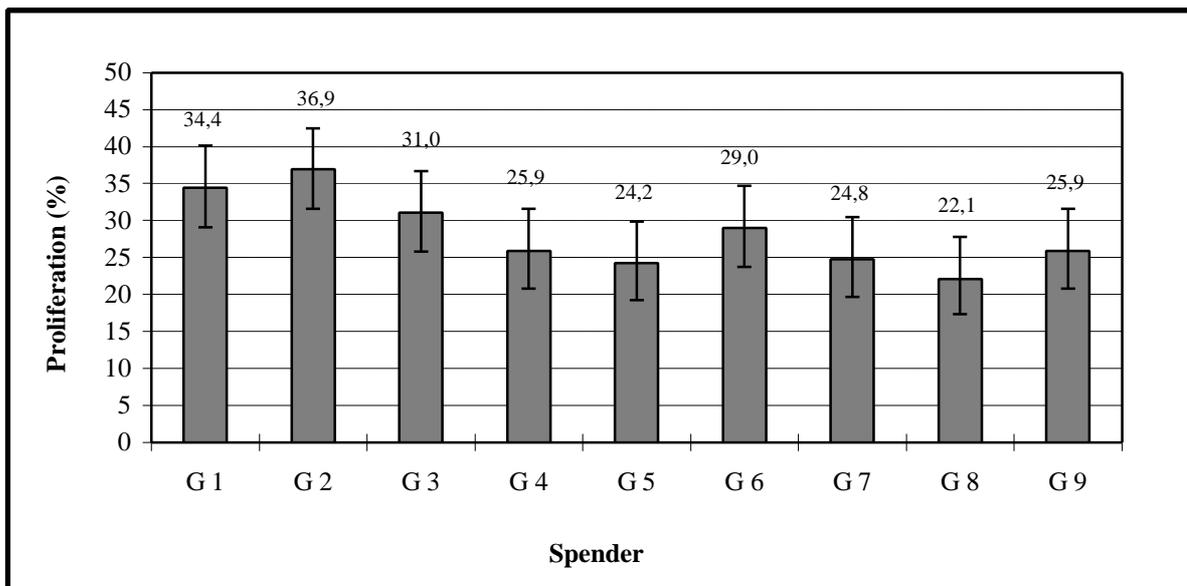
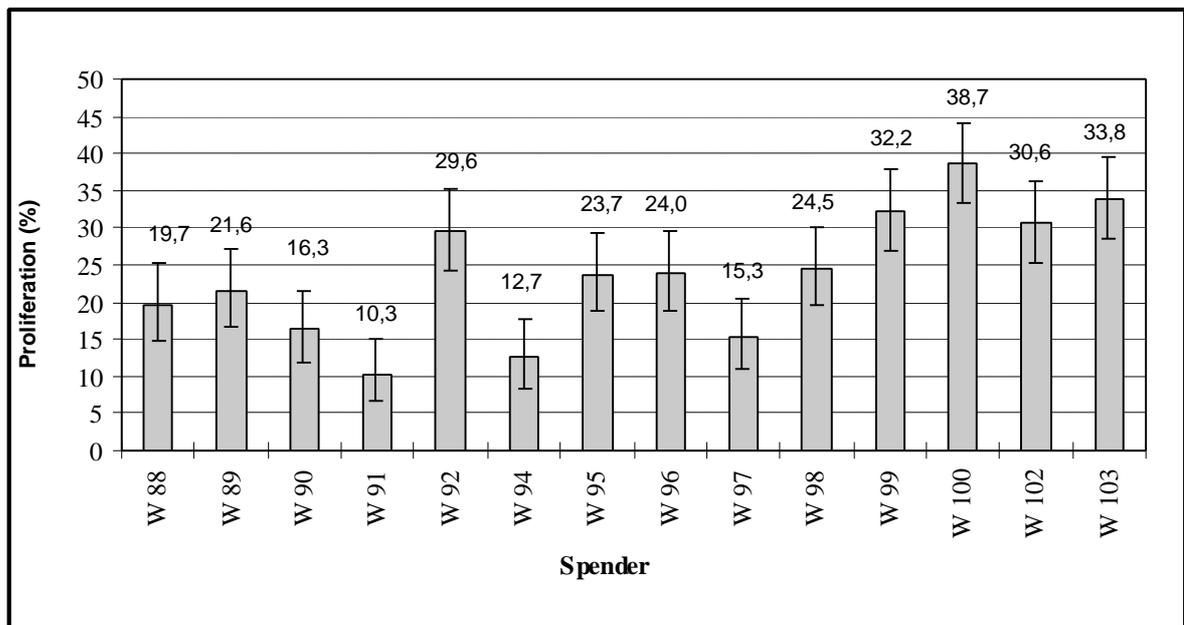


Abbildung 1: Die Proliferationsrate in unbestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender. Angegeben sind die 95% Konfidenzgrenzen unter der Annahme einer Binominalverteilung der Daten.

Bei den 14 Wismut-Spendern ohne Tumor wurde im Vergleich zu den gesunden Spendern kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate beobachtet. Der Mittelwert betrug 23,8%. Die Differenzen bei der Binuklearisierung zwischen den einzelnen Spendern sind in dieser Gruppe ausgeprägter als in der Kontrollgruppe. Die kleinste Proliferationsrate wurde beim Spender W91 (10,3%) beobachtet und die größte beim W100 mit 38,7%. In dieser Gruppe findet man 5 Spender mit einer Proliferationsrate unter 20% (W88,90,91,94 und 97), was bei den gesunden Spendern nicht beobachtet wurde.

In der Abbildung 2 sind die einzelnen Werte der Binuklearisierung der unbestrahlten Lymphocyten von Wismut-Arbeitern ohne Tumor abgebildet.

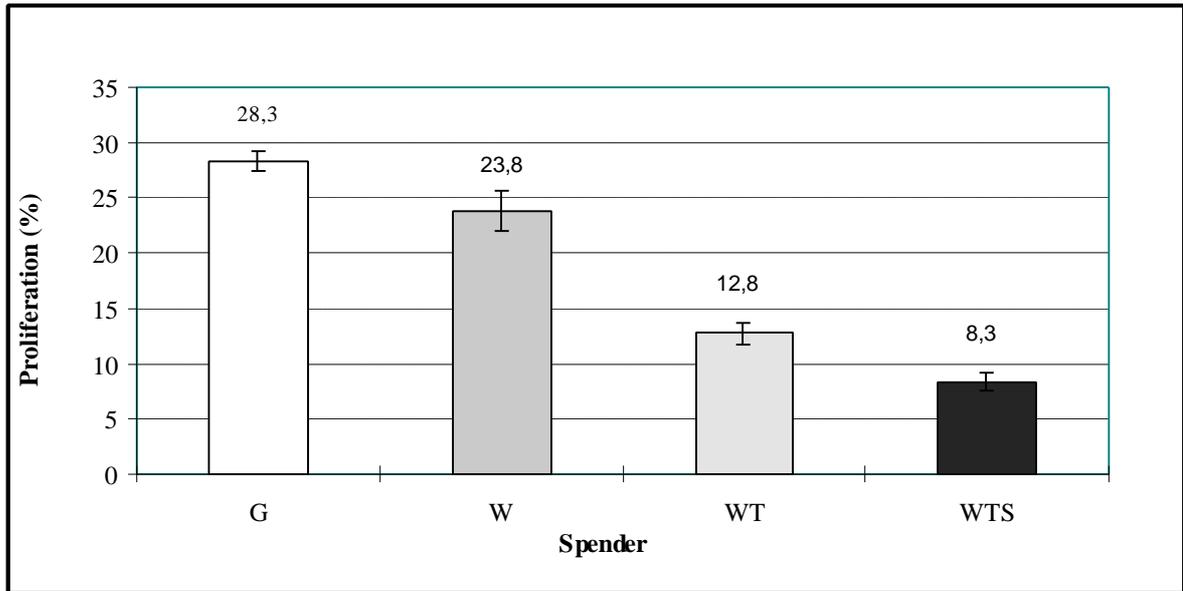
Die niedrigste Proliferationsrate wurde beim Spender W91 (10,3%) und die höchste beim Spender W100 (38,7%) beobachtet.



**Abbildung 2: Die Proliferationsrate in unbestrahlten Lymphocyten bei 14 Wismut-Arbeitern ohne Tumor. Angegeben sind die 95% Konfidenzgrenzen unter der Annahme einer Binominalverteilung der Daten.**

In der Gruppe von 55 Wismut-Arbeitern mit Tumor (WT+WTS) lag der mittlere Proliferationsgrad nur bei 11,7%. Dieser Wert ist signifikant niedriger als der entsprechende Wert der gesunden Spender ( $p < 0,0001$ ) und der Wismut-Arbeiter ohne Tumor ( $p < 0,0001$ ).

Im weiteren Verlauf der Arbeit konnten aufgrund der schlechteren Proliferationsrate der Zellen bzw. mangelnder Qualität der Präparate, nicht immer alle 55 Wismut Spender mit Tumor berücksichtigt werden. Die Anzahl der einbezogenen Präparate wird jeweils genannt.



**Abbildung 3: Die Proliferationsrate in unbestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender, Wismut-Arbeiter ohne Tumor und Wismut-Arbeiter mit Tumor. Angegeben ist der Standardfehler vom Mittelwert (G: n=9; W: n=14; WT: n=41; WTS: n=14).**

Aufgrund der Krankheitsgeschichte wurden Probanden unterschiedlich behandelt. Vierzehn Spender erhielten eine Strahlentherapie.

Betrachtet man den Proliferationsgrad bei den Wismut Probanden, die nicht strahlentherapiert wurden (WT), so lag er bei 12,8%. Dieser Wert ist signifikant niedriger als die Werte der gesunden Spender ( $p < 0,0001$ ) und Wismut-Arbeiter ohne Tumor ( $p < 0,0001$ ).

In einer Gruppe von vierzehn Wismut-Spendern mit Tumor, die eine Strahlentherapie erhielten (WTS), betrug die Proliferationsrate der Lymphocyten im Mittel nur 8,3%. Dies ist signifikant niedriger nicht nur gegenüber den gesunden Probanden ( $p < 0,0001$ ) und Wismut Arbeitern ohne Tumor ( $p < 0,0001$ ), sondern auch gegenüber den Wismut-Arbeitern mit Tumor ohne Strahlentherapie ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2 Proliferationsrate in bestrahlten Lymphocyten

Um die Dosis-Effekt Beziehung zu analysieren, wurden die Lymphocyten der gesunden Spender und Wismut-Arbeiter in vitro mit verschiedenen Dosen Röntgenstrahlen bestrahlt.

#### 3.1.2.1 Proliferation in bestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender

Tabelle 1 bietet eine Übersicht der einzelnen Proliferationsraten der Lymphocyten von gesunden Spendern.

**Tabelle 1: Die Proliferationsrate der Lymphocyten von gesunden Spendern nach in vitro Bestrahlung mit Röntgenstrahlen**

Dosis (Gy)	0	0,1	0,3	0,5	1	1,25	2	2,5
G 1	34,4	33,7	33,1	30,0	24,2	22,5	17,7	19,3
G 2	36,9	34,6	26,5	30,3	25,6	33,1	27,3	23,0
G 3	31,0	31,3	28,6	26,7	27,5	30,1	24,2	20,0
G 4	25,9	25,9	22,7	23,6	21,8	22,7	15,2	8,2
G 5	24,2	25,4	24,8	22,5	20,0	20,3	18,4	19,6
G 6	29,0	23,3	21,2	23,0	20,0	17,0	14,5	13,4
G 7	24,8	22,7	21,8	30,0	15,6	20,0	10,7	13,0
G 8	22,1	26,4	22,1	21,8	16,3	12,6	22,1	13,4
G 9	25,9	22,7	23,3	25,9	23,9	27,0	19,3	17,6

Bei einer Dosis von 0,1 Gy lag die Proliferationsrate zwischen 22,7% (Spender G7 und G9) bis 34,6% (Spender G2). Nicht bei allen Spendern wurde nach einer Bestrahlung mit 0,1 Gy eine Abnahme der proliferierenden Zellen beobachtet. Bei den Probanden G3 und G5 wurde eine leichte Erhöhung an binukleären Lymphocyten festgestellt. Diese Werte sind aber nicht signifikant höher als die Kontrollwerte ( $p=0,98$ ). Bei dem Spender G4 blieb die Proliferationsrate nach der Bestrahlung mit 0,1 Gy konstant.

Nach 0,3 Gy Röntgenstrahlen wurde in allen Fällen eine Abnahme der proliferierenden Zellen beobachtet. Dieser Wert ist nicht signifikant verschieden gegenüber der Proliferation nach Bestrahlung mit 0,1 Gy.

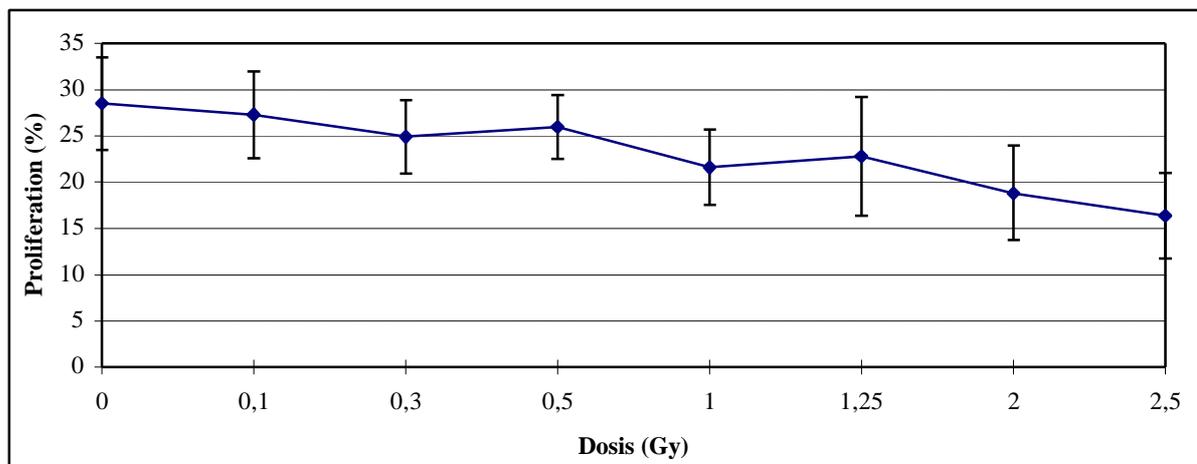
In 4 Fällen wurde nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy eine Senkung der Binuklearisierung festgestellt (G1, G3, G5 und G8) gegenüber 0,3 Gy. Bei den anderen Spendern wurde eine leichte Zunahme der binukleren Lymphocyten im Vergleich zu 0,3 Gy beobachtet.

Nach 1 Gy Röntgenstrahlen wurde bei den meisten Probanden (n=8) eine deutliche Abnahme der proliferierenden Zellen beobachtet. Nur beim Spender G 3 wurde eine leichte Erhöhung der Binuklearisierung im Verhältnis zu den Ergebnissen nach 0,5 Gy festgestellt.

Die Bestrahlung mit 1,25 Gy bewirkte in 4 Fällen eine Senkung der Proliferation im Vergleich zu dem letzten Meßpunkt (1 Gy). Die Lymphocyten aller anderen Spender zeigten eine erhöhte Proliferationsrate und beim Spender G9 war dieser Wert höher als in unbestrahlten Zellen. Nach 2 Gy Röntgenstrahlen wurde nur beim Spender G8 eine Zunahme der proliferierenden Lymphocyten festgestellt. Dieser Wert entsprach der Proliferation in unbestrahlten Zellen.

Fast in allen Fällen war die Binuklearisierung nach 2,5 Gy niedriger als nach 2 Gy Bestrahlung (G2, G3, G4, G6, G8, G9).

In der Abbildung 4 wurden die gemittelten Werte aller Spender zusammengestellt.



**Abbildung 4: Die Proliferationsrate der Lymphocyten von gesunden Spendern in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Angegeben ist der Standardfehler vom Mittelwert (G: n=9).**

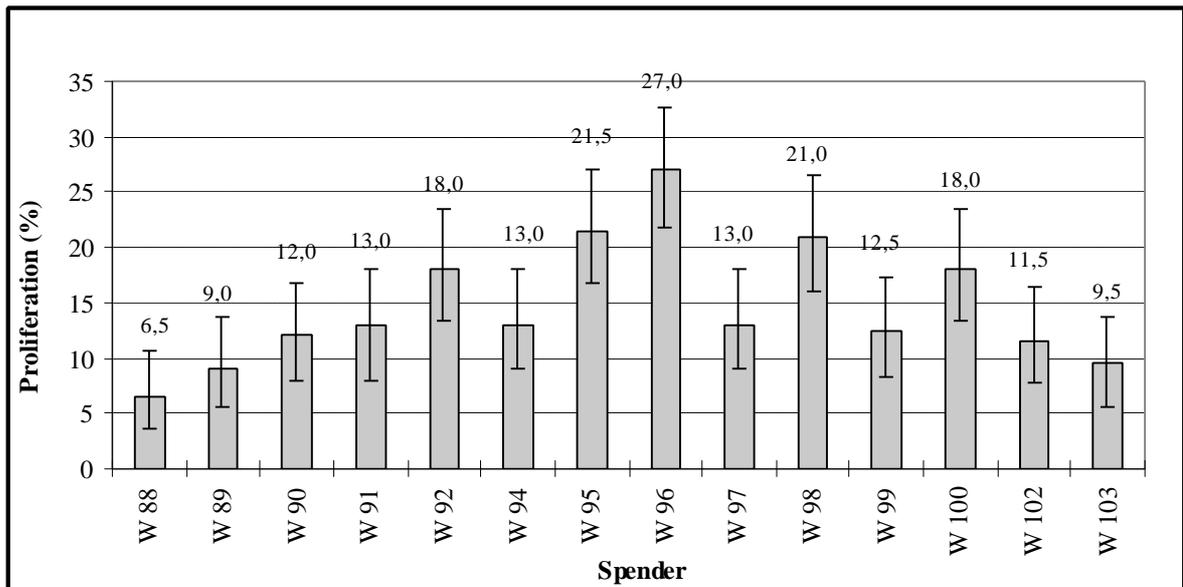
Trotz der großen Schwankungen auf der individuellen Ebene wurde auf dem Populationsniveau ein Abfall der Proliferationsrate mit steigender Dosis beobachtet.

Die Bestrahlung der Lymphocyten von gesunden Spendern wirkte hemmend auf die Binuklearisierung.

### 3.1.2.2 Proliferation der bestrahlten Lymphocyten der Wismut-Arbeiter ohne Tumor

Die Lymphocyten der Wismut-Arbeiter ohne Tumor wurden in vitro mit 2,5 Gy und 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt.

Nach einer Dosis von 2,5 Gy wurde beim Spender W88 (6,5%) die niedrigste und beim Spender W95 mit 21,5% die höchste Proliferationsrate ermittelt (Abbildung 5). Der Mittelwert betrug 14,7% ( $\pm 1,73$ ). Alle Werte wiesen einen signifikanten Unterschied gegenüber der Binuklearisierung der unbestrahlten Lymphocyten ( $p < 0,001$ ) auf.



**Abbildung 5: Die Proliferationsrate der bestrahlten Lymphocyten (2,5 Gy) der Wismut-Arbeiter ohne Tumor. Angegeben sind die 95% Konfidenzgrenzen unter der Annahme einer Binominalverteilung der Daten.**

Nach einer Bestrahlung der Lymphocyten mit 5 Gy Röntgenstrahlen wurde die Zellproliferation so sehr beeinträchtigt, daß eine Ermittlung der Binuklearisierung nicht möglich war.

### 3.1.2.3 Proliferation in bestrahlten Lymphocyten der Wismut-Arbeiter mit Tumor

Die Zellen wurden in vitro mit 2,5 Gy und 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt. Auch in dieser Gruppe war es aufgrund der großen Beeinträchtigung der Zellproliferation nicht immer möglich, die Proliferationsrate zu ermitteln.

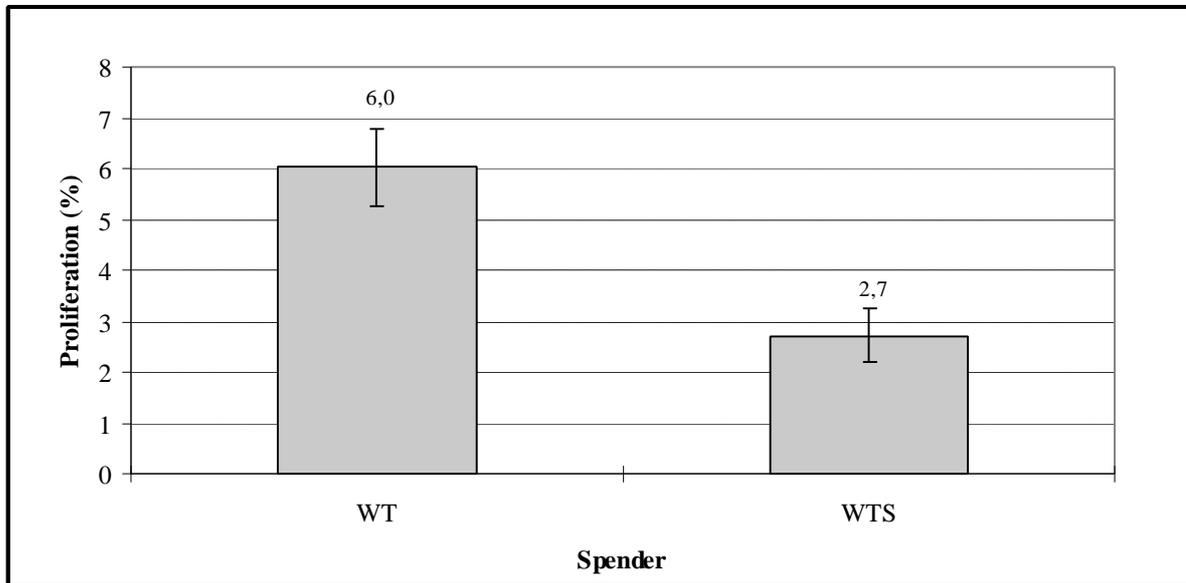
Die einzelnen Werte sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Die Proliferation der bestrahlten Lymphocyten (2,5 Gy) der Wismut-Arbeiter mit Tumor**

Spender	Proliferation (%)	Spender	Proliferation (%)
WT 3	3,3	WTS 2	2,9
WT 6	6,1	WTS 5	0,9
WT 7	1,9	WTS 8	3,3
WT 9	7,4	WTS 14	3,8
WT 10	1,0	WTS 28	6,5
WT 11	9,5	WTS 37	1,9
WT 12	8,6	WTS 52	3,0
WT 13	8,2	WTS 56	2,0
WT 18	3,3	WTS 64	0,5
WT 19	3,8	WTS 65	2,4
WT 23	2,9		
WT 24	10,0		
WT 25	5,6		
WT 26	2,4		
WT 27	0,5		
WT 29	1,9		
WT 30	23,0		
WT 33	3,8		
WT 34	3,8		
WT 44	2,4		
WT 46	7,4		
WT 51	2,4		
WT 53	12,0		
WT 54	3,4		
WT 55	6,0		
WT 57	11,0		
WT 58	7,8		
WT 59	12,6		
WT 60	9,0		
WT 61	7,4		
WT 62	2,0		
WT 63	2,4		
WT 66	4,3		
WT 67	7,8		

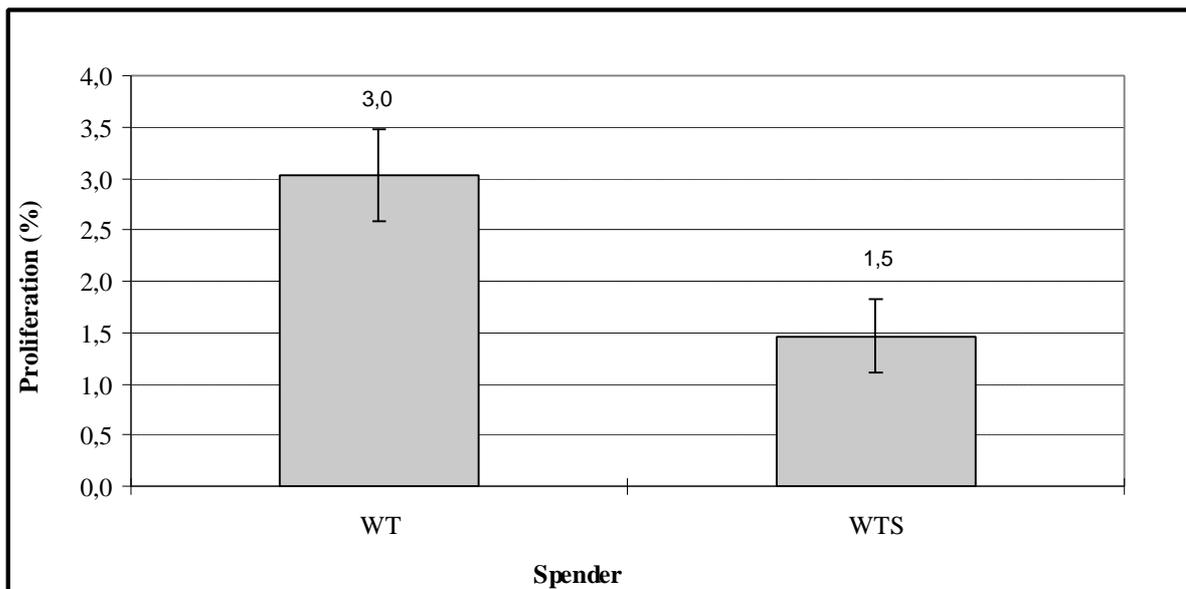
Der Proliferationsgrad der Lymphocyten aller Wismut-Arbeiter mit Tumor (WT+WTS) nach 2,5 Gy Bestrahlung lag bei 5,3% ( $\pm 0,99$ ). Dieser Wert ist signifikant niedriger im Vergleich zu der Binuklearisierung der Zellen in unbestrahlten Lymphocyten ( $p < 0,0001$ ) in der ganzen Gruppe.

Im Falle der sieben Spender, die strahlentherapiert wurden, war die Binuklearisierung der Lymphocyten nach 2,5 Gy in vitro Röntgenstrahlen deutlich niedriger (2,7%) als bei den Wismut-Spendern ohne Strahlentherapie (6,0%).



**Abbildung 6: Die Proliferation der bestrahlten Lymphocyten (2,5 Gy) der Wismut-Arbeiter mit Tumor. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler vom Mittelwert (WT: n=34; WTS: n=10).**

Nach einer in vitro Bestrahlung mit 5 Gy Röntgenstrahlen betrug der Mittelwert der Proliferation bei den Spendern ohne Strahlentherapie 3,0% ( $\pm 0,44$ ) und bei den Probanden, die einer Strahlentherapie unterzogen worden sind, lag er bei 1,5% ( $\pm 0,36$ ); (Abbildung 7).



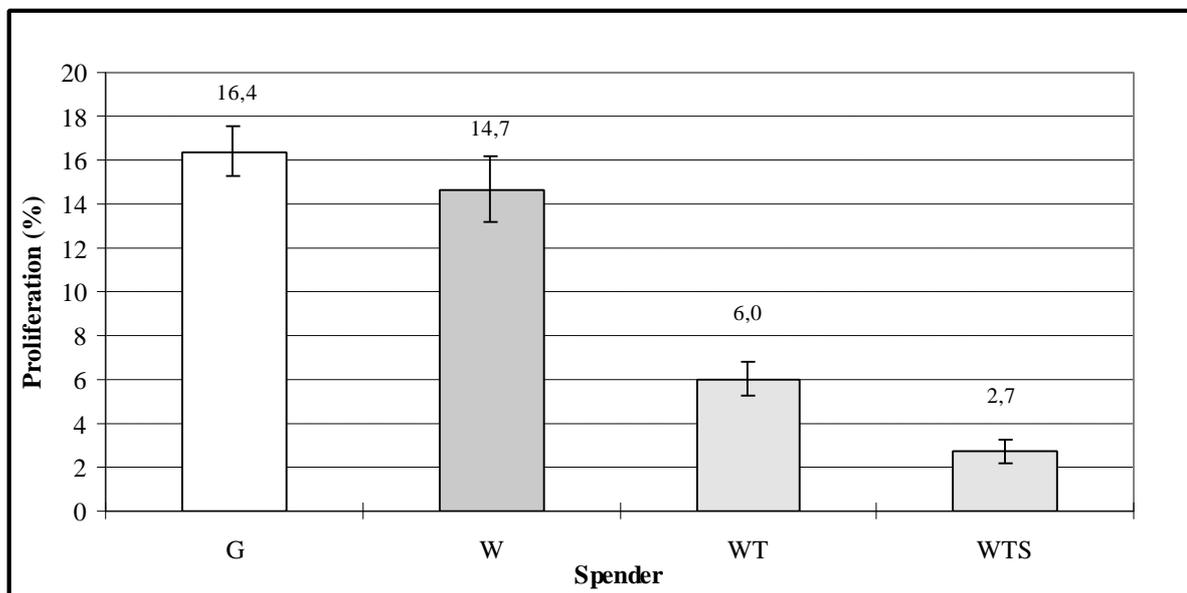
**Abbildung 7: Die Proliferation der bestrahlten Lymphocyten (5,00 Gy) der Wismut-Arbeiter mit Tumor. Angegeben ist der Standardfehler vom Mittelwert (WT: n=26; WTS: n=8)**

Alle diese Werte sind signifikant niedriger als die Proliferation nach 2,5 Gy in vitro Bestrahlung ( $p < 0,001$ ) und als die Proliferationswerte in unbestrahlten Lymphocyten der WismutSpender mit Tumor ( $p < 0,0001$ ).

### 3.1.2.4 Vergleich der Proliferationsraten der Lymphocyten von gesunden Spendern und Wismut-Arbeitern nach 2,5 Gy in vitro Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

In der Abbildung 8 wurde die Binuklearisierung der Lymphocyten aller untersuchten Gruppen nach einer Bestrahlung in vitro mit 2,5 Gy zusammengefaßt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,46$ ) bei der Binuklearisierung der Lymphocyten von WismutSpendern ohne Tumor gegenüber den gesunden Probanden ermittelt.

In der Gruppe von Wismut-Arbeitern mit Tumor wurde nach einer Bestrahlung in vitro mit 2,5 Gy eine hoch signifikant gesenkte Proliferationsrate festgestellt, nicht nur im Vergleich zu den gesunden Spendern ( $p < 0,0001$ ), sondern auch gegenüber dem WismutKollektiv ohne Tumor ( $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 8:** Die Proliferationsraten der bestrahlten Lymphocyten (2,5 Gy) von gesunden Spendern und Wismut-Arbeitern. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler vom Mittelwert (G: n=9; W: n=14, WT: n=34; WTS: n=10).

### 3.2 Analyse von Mikronuklei in binukleären Lymphocyten

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde die Abhängigkeit der Mikronukleus-Expression von der Strahlendosis analysiert. Das Blut mit den Lymphocyten von gesunden Spendern (G, n=9), von Wismut-Arbeitern ohne Tumor (W, n=14) und Wismut-Arbeitern mit Tumor (WT+WTS, n=55) wurde mit verschiedenen Dosen Röntgenstrahlen in vitro bestrahlt. Die letzte Gruppe, die Wismut-Arbeiter mit Tumoren repräsentiert, wurde ferner auf zwei Gruppen unterteilt:

1. Wismut-Arbeiter mit Tumor ohne Strahlentherapie (WT, n=41)
2. Wismut-Arbeiter mit Tumor, die eine Strahlentherapie erhielten (WTS, n=14).

#### 3.2.1 Mikronuklei in unbestrahlten Lymphocyten

Zunächst wurden die Häufigkeiten der spontanen Mikronuklei in Lymphocyten der gesunden Spender und der Wismut-Arbeiter bestimmt. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die spontanen Mikronukleus-Frequenzen und die Verteilung der Mikronuklei in den binukleären Zellen.

In jeder Gruppe enthielten die meisten Mikronukleus-positiven Zweikerner nur einen Mikronukleus. Maximal wurden fünf Mikronuklei pro binukleärer Zelle beobachtet (Mn/Bn). Bei den gesunden Spendern wurde die niedrigste Mikronukleusrate bei den Spendern G6 und G9 (0,009 Mikronuklei/Bn) und die höchste (0,023 Mikronuklei/Bn) bei Probanden G3 und G5 ermittelt.

In der Gruppe der Wismut-Arbeiter ohne Tumor betrug die niedrigste spontane Mikronukleusfrequenz 0,009 Mikronuklei/Bn-Zelle (W97) und die höchste 0,040 Mikronuklei/Bn-Zelle (W98).

Bei den Wismut-Arbeitern mit Tumor ohne Strahlentherapie wurden minimal 0,004 (WT25) und maximal 0,129 Mikronuklei (WT32) pro binukleärer Zelle gefunden.

Wismut-Arbeiter mit Tumor, die während einer Tumorbehandlung einer Strahlentherapie unterzogen wurden, wiesen deutlich mehr spontane Mikronuklei (niedrigster Wert 0,022 Mn/Bn und höchster Wert 0,145 Mn/Bn) auf.

#### Tabelle 3: Mikronuklei in unbestrahlten Lymphocyten

Tabellenkürzel: Mn/Bn = Mikronukleuszahl pro Zweikerner, Bn = Gesamtzahl Zweikerner,

Di = Dispersions-Index [ $Di = SD^2 / (Mn/Bn)$ , siehe Edwards et al., 1979],  $\ddot{U}$  = Übertverteilung.

**a) gesunde Spender**

Spender	Bn	Bn-Zellen mit n (0,1,2,3,4,5) Mikronuklei						Di	Mn/Bn
		0	1	2	3	4	5		
G 1	1000	983	17					0,98	0,017
G 2	1000	985	15					0,98	0,015
G 3	1000	979	20		1			1,24	$\ddot{U}$ 0,023
G 4	1000	987	11	1	1			1,48	$\ddot{U}$ 0,016
G 5	1000	984	12	3			1	2,10	$\ddot{U}$ 0,023
G 6	1000	993	5	2				1,43	$\ddot{U}$ 0,009
G 7	1000	988	12					0,99	0,012
G 8	1000	989	11					0,99	0,011
G 9	1000	992	7	1					$\ddot{U}$ 0,009
S	9000	8880	110	7	2	0	1	<b>Mw.</b> 1,33	$\ddot{U}$ 0,015

:

**b) Wismut-Spender ohne Tumor**

Spender	Bn	Bn-Zellen mit n (0,1,2,3,4,5) Mikronuklei						Di	Mn/Bn
		0	1	2	3	4	5		
W 88	1000	989	11					0,99	0,011
W 89	1000	987	12	1				1,13	$\ddot{U}$ 0,014
W 90	1000	981	18		1			1,26	$\ddot{U}$ 0,021
W 91	1000	969	26	4	1			1,34	$\ddot{U}$ 0,037
W 92	1000	986	12	2				1,23	$\ddot{U}$ 0,016
W 94	1000	978	21	1				1,06	0,025
W 95	1000	988	10	1			1	2,28	U 0,019
W 96	1000	970	24	4	2			1,49	U 0,038
W 97	1000	992	7	1				1,21	$\ddot{U}$ 0,009
W 98	1000	970	22	6	2			1,56	$\ddot{U}$ 0,040
W 99	1000	989	9		2			1,79	$\ddot{U}$ 0,015
W 100	1000	987	12	1				1,13	$\ddot{U}$ 0,014
W 102	1000	985	14		1			1,34	$\ddot{U}$ 0,017
W 103	1000	980	17	3				1,24	$\ddot{U}$ 0,023
S	14000	13751	215	24	9	0	1	<b>Mw.</b> 1,41	$\ddot{U}$ 0,022

:

**c) Wismut-Spender mit Tumor ohne Strahlentherapie**

Spender	Bn	Bn-Zellen mit n (0,1,2,3,4,5) Mikronuklei						Di	Mn/Bn		
		0	1	2	3	4	5				
WT 3	1000	990	9	1				1,18	Ü	0,011	
WT 6	1000	991	8			1		1,54	Ü	0,011	
WT 7	1000	985	13	2				1,22	Ü	0,017	
WT 9	1000	986	14					0,98		0,014	
WT 10	1002	984	11	4	3			1,90	Ü	0,028	
WT 11	1000	982	18					0,98		0,018	
WT 12	985	984	1					1,00		0,017	
WT 13	1000	987	11	2				1,25	Ü	0,015	
WT16	1000	986	13			1		1,36	Ü	0,016	
WT 18	1000	977	18	3	2			1,60	Ü	0,030	
WT 19	1000	952	41	6	1			1,26	Ü	0,056	
WT 23	1000	980	19	1				1,07		0,021	
WT 24	1000	987	12	1				1,29	Ü	0,014	
WT 25	1000	997	2	1				1,49	Ü	0,004	
WT 26	1000	988	9	2	1			1,61	Ü	0,016	
WT 27	1000	984	11	5				1,46	Ü	0,021	
WT 28	1000	973	22	5				1,28	Ü	0,032	
WT 29	1000	988	8	4				1,48	Ü	0,016	
WT 32	1000	912	57	22	8	1		1,68	Ü	0,129	
WT 33	1000	992	7				1	2,08	Ü	0,011	
WT 34	1000	994	3	3				1,66	Ü	0,009	
WT 43	1000	994	6					0,99		0,006	
WT 44	1000	985	13	2				1,22	Ü	0,017	
WT 45	1000	992	8					0,99		0,008	
WT 46	1000	991	9					0,99		0,009	
WT 47	1000	986	11	2	1			1,54	Ü	0,018	
WT 48	1000	988	10	1	1			1,52	Ü	0,015	
WT 49	1000	988	11	1				1,14	Ü	0,013	
WT 50	1000	956	37	7				1,22	Ü	0,051	
WT 51	1000	988	12					0,99		0,012	
WT 53	1000	993	6			1		1,70	Ü	0,009	
WT 54	1000	992	7			1		1,60	Ü	0,010	
WT 55	1000	995	5					0,99		0,005	
WT 57	1000	986	12	2				1,23	Ü	0,016	
WT 58	1000	976	21	3				1,97	Ü	0,027	
WT 59	1000	991	9					0,99		0,009	
WT 60	1000	987	12	1				1,13	Ü	0,014	
WT 61	1000	983	16	1				1,09	Ü	0,018	
WT 62	1000	983	16	1				1,09	Ü	0,018	
WT 63	1000	975	20	4	1			1,42	Ü	0,031	
WT 66	1000	988	11	1				1,14	Ü	0,013	
WT 67	1000	989	11					0,99		0,011	
$\Sigma$	41987	41305	570	88	22	2	0	<b>Mw.</b>	1,39	Ü	0,020

:

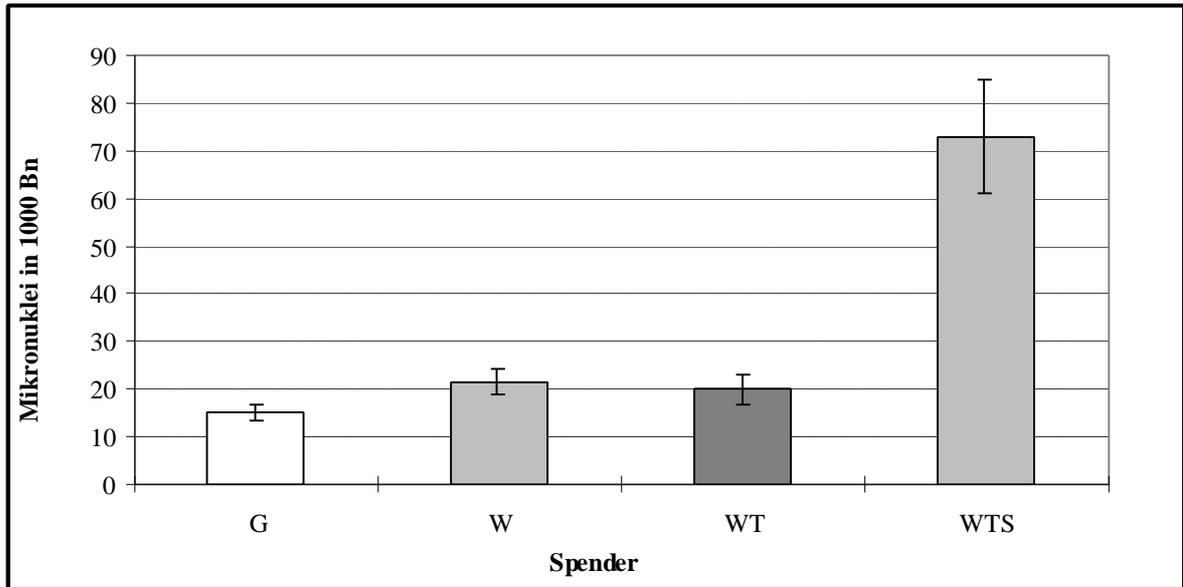
d) Wismut-Spender mit Tumor nach Strahlentherapie

Spender	Bn	Bn-Zellen mit n (0,1,2,3,4,5) Mikronuklei						Di	Mn/Bn	
		0	1	2	3	4	5			
WTS 2	1000	961	30	8			1	1,51	Ü	0,050
WTS 5	1000	922	55	21	2			1,42	Ü	0,103
WTS 8	504	466	32	6				1,19	Ü	0,087
WTS 14	1000	896	69	29	6			1,50	Ü	0,145
WTS 15	1000	980	18	2				1,16	Ü	0,022
WTS 17	1000	937	47	15	1			1,37	Ü	0,080
WTS 28	1000	933	45	14	7	1		1,74	Ü	0,098
WTS 31	706	645	42	16	3			1,48	Ü	0,117
WTS 35	0									
WTS 37	1000	979	14	7				1,47	Ü	0,028
WTS 52	1000	981	13	4	2			1,71	Ü	0,027
WTS 56	1007	915	65	20	5	2		1,61	Ü	0,127
WTS 64	1000	979	17	3	1			1,44	Ü	0,026
WTS 65	1000	968	29	3				1,14	Ü	0,035
$\Sigma$	12217	11562	476	148	27	4	0	<b>Mw.</b> 1,51	Ü	0,071

:

Aus Tabelle 3 wird ersichtlich, daß sich die MikronukleusSpontanraten in Lymphocyten von gesunden Probanden (Mittelwert 0,015 Mn/Bn), Wismut-Arbeitern ohne Tumor (Mittelwert 0,021 Mn/Bn) und Wismut-Arbeitern mit Tumor ohne Strahlentherapie (Mittelwert 0,020 Mn pro Bn-Zelle) nicht signifikant unterscheiden. In allen Fällen wurden allerdings interindividuelle Variabilitäten festgestellt. Es ergab sich ein Variabilitätsfaktor (Quotient aus höchster und niedrigster Mikronukleusrate) von 2,6 für Normalspender, 4,5 für WismutSpender ohne Tumor und 32,3 für Wismut-Spender mit Tumor ohne Strahlentherapie.

Die spontane Mikronukleushäufigkeit in jeder der oben erwähnten Gruppen unterscheidet sich hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) von der Mikronukleusrate der WismutSpender mit Tumor, die sich einer Strahlentherapie unterziehen mußten (Mittelwert 0,071 Mn/Bn). (Abbildung 9)



**Abbildung 9: Mikronukleushäufigkeit in unbestrahlten Lymphocyten von gesunden Spendern und Wismut-Arbeitern. Angegeben ist der Standardfehler vom Mittelwert (G: n=9; W: n=14; WT: n=41; WTS: n=14).**

### 3.2.2 Dosiswirkungsbeziehung nach in vitro Bestrahlung

In jeder untersuchten Gruppe wurde ein Anstieg der Mikronukleusfrequenz nach in vitro Bestrahlung beobachtet. Dosisabhängig stieg auch die Zahl der binukleären Zellen, die mehr als einen Mikronukleus enthielten. Es wurden Zweikerner mit bis zu 9 Mn/Bn beobachtet. Tabellen 4, 5, 6 und 7 geben einen Überblick der Häufigkeiten und Verteilungen der induzierten Mikronuklei von gesunden Personen, Wismut-Arbeitern ohne Tumor und Wismut-Arbeitern mit Tumor.

#### 3.2.2.1 Strahleninduzierte Mikronuklei in Lymphocyten gesunder Spender

In dieser Gruppe wurden die Mikronukleushäufigkeiten nach 0,10; 0,30; 0,50; 1,00; 1,25; 2,00 und 2,50 Gy bestimmt. Unser Interesse galt insbesondere der Ermittlung der Mikronukleushäufigkeiten im niedrigen Dosisbereich, also bis zu 0,50 Gy. Die Untersuchungen haben ergeben, daß sich die Mikronukleushäufigkeit nach jeder dieser Dosen vom Kontrollwert signifikant unterscheidet. Bereits nach 0,10 Gy Röntgenstrahlen wurden auf dem Populationsniveau signifikant mehr Mikronuklei in binukleären Zellen (n=9, Mittelwert: 0,026 Mn/Bn) gefunden als in unbestrahlten Lymphocyten ( $p < 0,001$ ). Es wurde dagegen kein Unterschied zwischen 0,10 und 0,30 Gy (Mittelwert: 0,033 Mn/Bn,  $p = 0,287$ ) festgestellt.

Nach 0,50 Gy Röntgenstrahlen wurde ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,0001$ ) der Mikronukleushäufigkeit (Mittelwert: 0,059 Mn/Bn) gegenüber 0,30 Gy beobachtet. Die Untersuchungen der Mikronukleushäufigkeiten nach Dosen über 0,50 Gy ergaben, daß sich diese zwischen den einzelnen Behandlungen hoch signifikant unterscheiden. Nach der höchsten in diesen Experimenten eingesetzten Dosis (2,50 Gy) wurden 0,620 Mn/Bn ermittelt.

Hinsichtlich der Anwendbarkeit des Mikronukleustestes als biologischer Indikator wurden die spontanen und strahleninduzierten Mikronukleushäufigkeiten der einzelnen Spender miteinander verglichen.

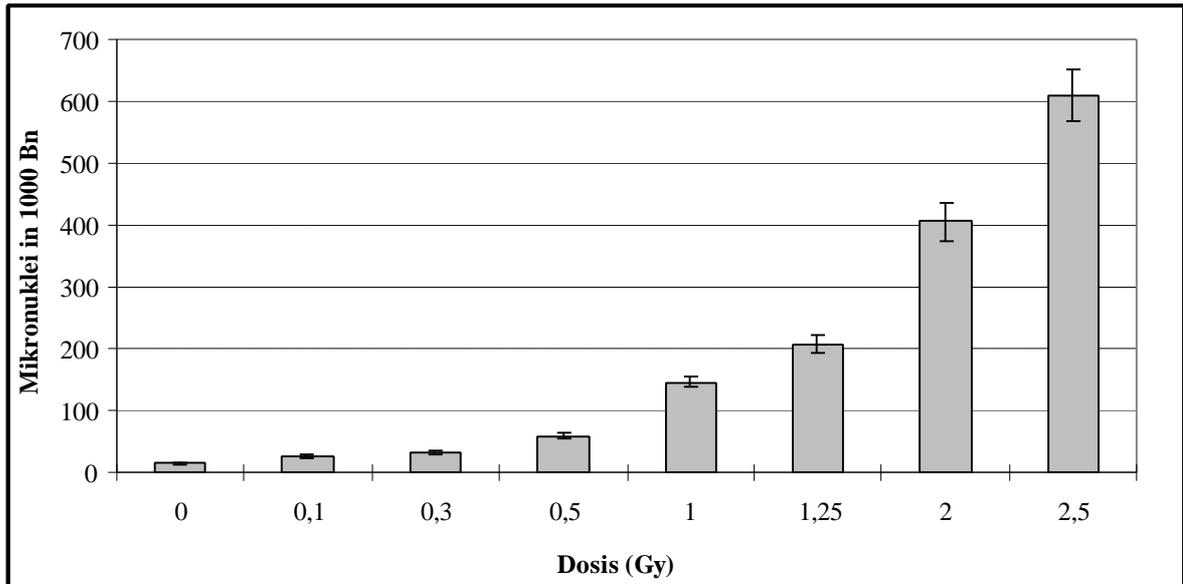
Die Untersuchungen auf dem individuellen Niveau ergaben, daß nur bei zwei Spendern (G7, G9) ein signifikanter Unterschied zwischen den Mikronukleusraten der unbestrahlten und der mit 0,10 Gy bestrahlten Lymphocyten beobachtet wurde. Nach 0,30 Gy wurden in 7 von 9 Fällen signifikante Unterschiede gegenüber der spontanen Mikronukleushäufigkeit ermittelt. Erst ab 0,50 Gy Bestrahlung wurden bei allen Spendern signifikante Unterschiede der Mikronukleushäufigkeiten gegenüber den spontanen Mikronukleusraten ermittelt.

Die Dosiswirkungsbeziehung der gesunden Spender zeigte einen nichtlinearen Anstieg der Mikronukleushäufigkeit mit der Dosis. Bildet man für die Mikronukleusraten der Lymphocyten der gesunden Spender für jede Dosis aus den individuellen Daten das gewichtete Mittel, so ergibt sich eine Dosiswirkungsbeziehung, die statistisch mit dem linearquadratischen Modell kompatibel ist ( $y = c + \alpha D + \beta D^2$ ;  $y$  = Frequenz der Mikronuklei (Mn/Bn),  $D$  = Dosis (Gy),  $c$  = spontane Mikronukleushäufigkeit,  $\alpha$  und  $\beta$  sind Koeffizienten):

$$y = 0,017 + 0,049 D + 0,075 D^2$$

(Die Abweichung in der MikronukleusSpontanhäufigkeit, die in der Gleichung angegeben ist (0,017Mn/Bn), und der gezählten Spontanhäufigkeit (0,015 Mn/Bn), resultiert aus der Kurvenanpassung).

In der Abbildung 10 wurden die Mikronukleushäufigkeiten in zweikernigen Lymphocyten von gesunden Spendern dargestellt.



**Abbildung 10: Mikronukleusfrequenzen in bestrahlten Lymphocyten von gesunden Spendern. Angegeben ist der Standardfehler vom Mittelwert (G: n=9).**

**Tabelle 4: Mikronuklei in bestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender**

**a) 0,10 Gray**

Spender	Bn	Bn-Zellen mit n (0,1,2,3,4,5) Mikronuklei						Di	Mn/Bn	
		0	1	2	3	4	5			
G 1	1000	979	19	2				1,15	Ü	0,023
G 2	1000	976	19	5				1,32	Ü	0,029
G 3	1000	967	29	3	1			1,28	Ü	0,038
G 4	1000	975	21	4				1,25	Ü	0,029
G 5	1000	973	20	7				1,38	Ü	0,034
G 6	1000	989	10	1				1,15	Ü	0,012
G 7	1000	977	17	5	1			1,50	Ü	0,030
G 8	1000	982	18					0,98		0,018
G 9	1000	979	18	2	1			1,38	Ü	0,025
S	9000	8797	171	29	3	0	0	<b>Mw.</b> 1,29	Ü	0,026

:

**b) 0,30 Gray**

Spender	Bn	Bn-Zellen mit n (0,1,2,3,4,5) Mikronuklei						Di	Mn/Bn		
		0	1	2	3	4	5				
G 1	1000	980	16	4				1,31	Ü	0,024	
G 2	1000	968	30	2				1,08	Ü	0,034	
G 3	1000	956	40	3	1			1,19	Ü	0,049	
G 4	1000	968	30	2				1,08	Ü	0,034	
G 5	1000	965	28	7				1,29	Ü	0,042	
G 6	1000	982	16	2				1,18	Ü	0,020	
G 7	1000	968	30	2				1,08	Ü	0,034	
G 8	1000	966	30	3	1			1,27	Ü	0,039	
G 9	1000	976	24					0,98		0,024	
S	9000	8729	244	25	2	0	0	Mw.	1,17	Ü	0,033

:

**c) 0,50 Gray**

Spender	Bn	Bn-Zellen mit n (0,1,2,3,4,5) Mikronuklei						Di	Mn/Bn		
		0	1	2	3	4	5				
G 1	1000	947	50	3				1,05	Ü	0,056	
G 2	1000	929	68	3				1,00		0,074	
G 3	1000	941	53	3	2	1		1,37	Ü	0,069	
G 4	1000	945	46	8	1			1,27	Ü	0,065	
G 5	1000	939	50	8	2	1		1,45	Ü	0,076	
G 6	1000	966	32	2				1,07		0,036	
G 7	1000	958	39	3				1,09	Ü	0,045	
G 8	1000	944	48	8				1,19	Ü	0,064	
G 9	1000	957	38	3	2			1,31	Ü	0,050	
S	9000	8526	424	41	7	2	0	Mw.	1,22	Ü	0,059

:

**d) 1,00 Gray**

Spender	Bn	Bn-Zellen mit n (0,1,2,3,4,5) Mikronuklei						Di	Mn/Bn	
		0	1	2	3	4	5			
G 1	1000	859	116	22	3			1,19	Ü	0,169
G 2	1000	887	101	10	1		1	1,23	Ü	0,129
G 3	1000	877	108	11	3	1		1,22	Ü	0,143
G 4	1000	911	75	8	6			1,37	Ü	0,109
G 5	1000	881	105	14				1,08		0,133
G 6	1000	831	157	9	3			1,01		0,184
G 7	1000	878	100	20	1	1		1,25	Ü	0,147

G 8	1000	866	102	27	3	2			1,38	Ü	0,173
G 9	1000	893	92	13	1	1			1,23	Ü	0,125
S	9000	7883	956	134	21	5	1	<b>Mw.</b>	1,22	Ü	0,146

## e) 1,25 Gray

Spender	Bn	Bn-Zellen mit n(0,1,2,3,4,5) Mikronuklei						Di	Mn/Bn		
		0	1	2	3	4	>= 5				
G 1	1000	830	139	30			1	1,19	Ü	0,205	
G 2	1000	854	124	18	4			1,18	Ü	0,172	
G 3	1000	861	110	21	7	1		1,37	Ü	0,177	
G 4	1000	872	116	12				1,03		0,140	
G 5	1000	832	145	19	2	2		1,18	Ü	0,197	
G 6	1000	764	181	53	2			1,11	Ü	0,293	
G 7	1000	771	196	30	3			1,03		0,265	
G 8	1000	817	154	24	3	2		1,19	Ü	0,219	
G 9	1000	820	160	18	1	1		1,06	Ü	0,203	
S	9000	7421	1325	225	22	6	1	<b>Mw.</b>	1,52	Ü	0,219

## f) 2,00 Gray

Spender	Bn	Bn-Zellen mit n (0,1,2,3,4,5) Mikronuklei						Di	Mn/Bn		
		0	1	2	3	4	>=5				
G 1	1000	643	292	57	7		1	0,98		0,432	
G 2	1000	696	256	36	12			1,03		0,364	
G 3	1000	759	186	44	7	4		1,26	Ü	0,311	
G 4	1000	803	170	22	3	1	1	1,17	Ü	0,232	
G 5	1000	599	369	29	2	1		0,75		0,437	
G 6	1000	627	297	63	9	3	1	1,04		0,467	
G 7	1000	590	308	80	18	4		1,05		0,538	
G 8	1000	641	278	67	13		1	1,05		0,458	
G 9	1000	665	261	61	11	1	1	1,09	Ü	0,425	
S	9000	6023	2417	459	82	14	5	<b>Mw.</b>	1,05		0,407

## g) 2,50 Gray

Spender	Bn	Bn-Zellen mit n (0,1,2,3,4, 5) Mikronuklei						Di	Mn/Bn	
		0	1	2	3	4	>=5			
G 1	1000	632	287	61	14	4	2	1,14	Ü	0,479
G 2	1000	590	339	57	11	2	1	0,95		0,499
G 3	1000	667	235	84	10	3	1	1,18	Ü	0,450
G 4	1000	579	311	80	24	5	1	1,11	Ü	0,572

G 5	1000	451	359	137	41	10	2	1,04	0,807
G 6	1000	502	337	132	26	2	1	0,98	0,666
G 7	1000	449	404	111	28	8		0,91	0,742
G 8	1000	506	318	142	30	3	1	1,02	0,709
G 9	1000	528	322	118	28	3	1	1,04	0,659
S	9000	4904	2912	922	212	40	10	<b>Mw.</b> 1,05	0,623

:

### 3.2.2.2 Strahleninduzierte Mikronuklei in Lymphocyten der Wismut-Arbeiter ohne Tumor

Die Mikronukleushäufigkeiten wurden nach 2,50 Gy und 5,00 Gy Röntgenstrahlen analysiert. Die Bestimmung der Mikronukleusraten nach 2,50 Gy Röntgenstrahlen ergab einen hoch signifikanten Anstieg (Mittelwert: 0,578 Mn/Bn) gegenüber den Kontrollwerten ( $p < 0,0001$ ). Dieser Wert unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von den Mikronukleushäufigkeiten nach 2,50 Gy Bestrahlung in Lymphocyten der Kontrollpersonen (Abbildung 11).

Die einzelnen Werte der Wismut-Spender ohne Tumor sind in der Tabelle 5 dargestellt.

Wegen einer nahezu kompletten Hemmung der Zellproliferation war es nicht möglich, die Mikronukleushäufigkeiten nach einer Dosis von 5 Gy zu ermitteln.

**Tabelle 5: Mikronuklei in bestrahlten Lymphocyten (2,50 Gy) der Wismut-Arbeiter ohne Tumor**

Spender	Bn	Bn-Zellen mit n (0,1,2,3,4,5) Mikronuklei						Di	Mn/Bn
		0	1	2	3	4	>=5		
W 88	400	139	139	86	27	8	1	0,98	1,702
W 89	1000	398	366	169	57	8	2	0,97	0,917
W 90	1000	543	308	120	23	5	1	1,07	Ü 0,642
W 91	1000	478	305	153	54	10		1,11	Ü 0,813
W 92	1000	479	338	146	32	5		0,98	0,746
W 94	1000	510	326	126	31	3	4	1,08	Ü 0,705
W 95	1000	790	187	22	1			0,98	0,234
W 96	1000	598	290	93	14	4	1	1,09	Ü 0,539
W 97	1000	652	257	74	17			1,09	Ü 0,456
W 98	1000	620	279	82	17	2		1,07	Ü 0,502
W 99	1000	712	242	34	12			1,06	Ü 0,346
W 100	1000	443	371	146	33	7		0,94	0,790
W 102	1000	458	372	136	31	3		0,91	0,749
W 103	1000	574	308	88	23	5	2	1,13	Ü 0,583
S	13400	7394	4088	1475	372	60	11	<b>Mw.</b> 1,09	Ü 0,630

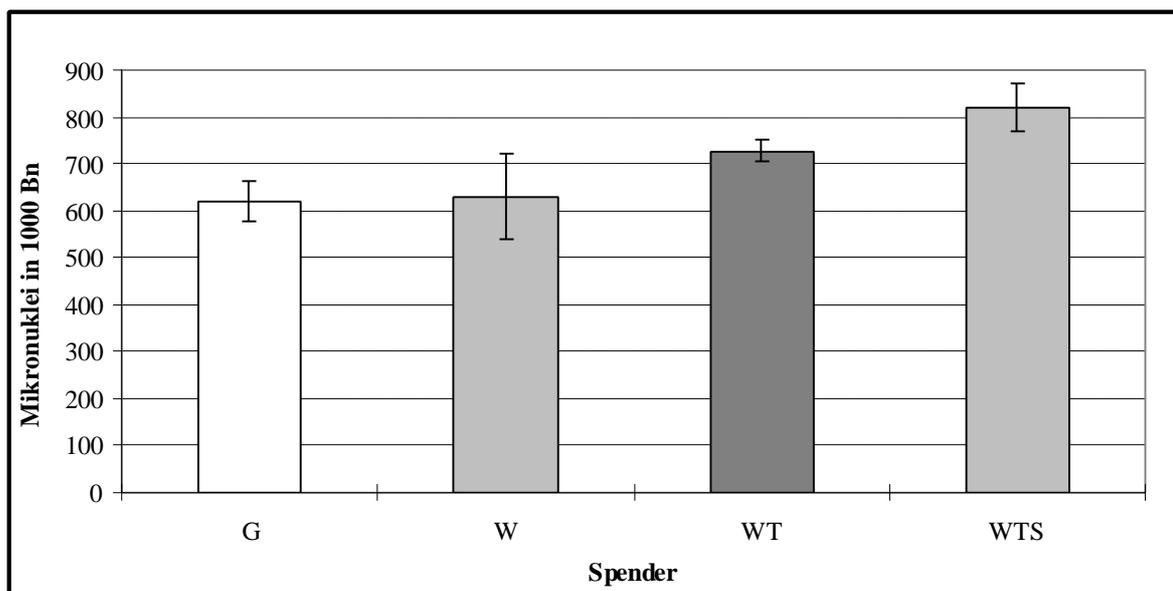
:

### 3.2.2.3 Strahleninduzierte Mikronuklei in Lymphocyten der Wismut-Arbeiter mit Tumor

Tabellen 6 und 7 geben einen Überblick über die Frequenzen und die Verteilungen der Mikronuklei nach einer *in vitro* Bestrahlung der Lymphocyten von Wismut-Spendern mit Tumor mit 2,5 und 5 Gy Röntgenstrahlen.

Nach einer Dosis von 2,5 Gy betrug die Mikronukleushäufigkeit in Lymphocyten der Wismut-Arbeiter ohne Strahlentherapie 0,727 Mn/Bn. Bei den Wismut-Arbeitern, die eine Strahlentherapie erhielten, betrug die Mikronukleushäufigkeit 0,821 Mn/ Bn. Beide Werte unterscheiden sich statistisch nicht voneinander, sind aber signifikant höher als die Mikronukleusraten in unbestrahlten Lymphocyten beider Gruppen ( $p < 0,0001$ ).

Die Mikronukleusraten nach 2,5 Gy Röntgenstrahlen von Wismut-Arbeitern mit Tumor sind signifikant höher im Vergleich zu den Mikronukleushäufigkeiten bei den gesunden Spendern und den Wismut-Arbeitern ohne Tumor (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Mikronukleusfrequenzen in bestrahlten Lymphocyten (2,50 Gy) von gesunden Spendern und Wismut-Arbeitern. Die Fehlerbalken zeigen**

**den Standardfehler vom Mittelwert (G: n=9; W: n=14, WT: n=33, WTS: n=10) an.**

Die Ermittlungen der Mikronukleushäufigkeiten nach einer Dosis von 5 Gy ergaben

1,75 Mn/Bn bei den Spendern ohne Strahlentherapie und 1,69 Mn/Bn bei strahlentherapierten Probanden (siehe Tabelle 6 a) und b)). Diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0,83$ ).

**Tabelle 6: Mikronuklei in bestrahlten Lymphocyten der Wismut-Arbeiter mit Tumor ohne Strahlentherapie**

**a) 2,50 Gray**

Spender	Bn	Bn-Zellen mit n (0,1,2,3,4,5) Mikronuklei						Di	Mn/Bn
		0	1	2	3	4	>=5		
WT 3	612	272	215	95	25	4	1	0,99	0,818
WT 6	1000	479	379	114	26	2		0,89	0,693
WT 7	1000	549	312	107	28	4			0,626
WT 9	1000	421	373	161	40	4	1	0,92	0,836
WT 10	905	419	348	107	26	3	2	0,94	0,731
WT 11	1000	449	355	153	34	6	3	0,99	0,804
WT 12	1000	419	381	149	40	11		0,95	0,843
WT 13	1004	366	372	197	57	10	2	0,93	0,984
WT 18	1000	485	344	131	31	8	1	1,03	0,736
WT 19	1000	461	378	130	25	6		0,92	0,737
WT 23	994	577	306	90	17	4		1,04	0,556
WT 24	1000	473	355	139	29	3	1	0,95	0,739
WT 25	1000	536	339	103	19	3		0,97	0,614
WT 26	891	482	289	100	18	2		0,98	0,618
WT 27	900	542	249	93	12	3	1	1,10	Ü 0,544
WT 29	1010	542	335	108	18	5	2	1,04	0,629
WT 30	1000	449	356	146	39	10		0,99	0,505
WT 33	1000	488	359	125	23	4	1	0,95	0,699
WT 44	1005	538	303	121	36	6	1	1,13	Ü 0,678
WT 46	400	194	156	35	11	4		0,68	0,687
WT 51	1000	567	306	99	24	4		1,07	0,592
WT 53	1000	451	375	137	28	9		0,95	0,769
WT 54	1000	456	349	155	36	4		0,95	0,780
WT 55	1000	473	329	155	33	6	4	1,06	0,782
WT 57	1000	325	410	201	52	11	1	0,84	0,967
WT 58	1000	253	450	229	53	13	2	0,73	1,129
WT 59	1000	507	337	122	25	6	3	1,06	0,697
WT 60	1000	497	359	123	17	4		0,92	0,672
WT 61	1000	484	361	126	26	3		0,92	0,703
WT 62	1000	456	376	128	34	6		0,95	0,758
WT 63	1000	513	355	109	17	6		0,96	0,648



**Tabelle 7: Mikronuklei in bestrahlten Lymphocyten der Wismut-Arbeiter mit Tumor nach Strahlentherapie**

**a) 2,50 Gray**

Spender	Bn	Bn-Zellen mit n (0,1,2,3,4,5) Mikronuklei						Di	Mn/Bn
		0	1	2	3	4	>=5		
WTS 2	1000	346	382	196	59	11	6	0,95	1,017
WTS 5	896	450	308	107	25	5	1	1,02	0,694
WTS 8	284	125	109	39	11			0,88	0,774
WTS 14	678	225	257	135	43	15	3	0,97	1,078
WTS 28	1007	443	370	137	38	13	6	1,09	Ü 0,835
WTS 37	722	309	305	94	11	3		0,79	0,745
WTS 52	1000	479	347	139	26	6	3	1,03	0,742
WTS 56	947	301	402	178	48	14	4	0,88	1,033
WTS 64	574	285	203	70	14	2		0,95	0,684
WTS 65	1000	548	331	94	21	6		1,03	0,606
$\Sigma$	8108	3511	3014	1189	296	75	23	<b>Mw.</b> 0,99	0,821

:

**b) 5,00 Gray**

Spender	Bn	Bn-Zellen mit n (0,1,2,3,4,5) Mikronuklei						Di	Mn/Bn
		0	1	2	3	4	5		
WTS 2	336	41	86	99	53	36	21	0,92	2,089
WTS 5	374	69	131	100	48	20	6	0,89	1,569
WTS 14	214	13	50	65	53	24	9	0,67	2,242
WTS 28	436	61	179	116	59	15	6	0,75	1,557
WTS 52	500	71	197	165	50	15	2	0,65	1,494
WTS 56	227	30	89	58	30	12	8	0,88	1,690
WTS 64	250	71	90	56	22	10	1	0,98	1,268
WTS 65	500	83	154	168	66	17	12	0,81	1,636
$\Sigma$	2837	439	976	827	381	149	65	<b>Mw.</b> 0,84	1,693

:

**3.2.3 Statistische Verteilung der Mikronuklei in binukleären Lymphocyten**



G 1	100	21	77	2				79		79,00
G 2	200	47	116	30	1	6		153		76,50
G 3	115	24	61	26	4			91		79,13
G 4	123	34	52	24	9	3	1	89		72,36
G 5	105	27	46	24	6	2		78		74,29
G 6	110	33	64	10	2	1		77		70,00
G 7	103	24	69	10				79		76,70
G 8	108	31	62	11	1	3		77		71,30
G 9	102	26	64	11	0	1		76		74,51
S	1066	267	611	148	23	16	1	799	<b>Mw.:</b>	74,86

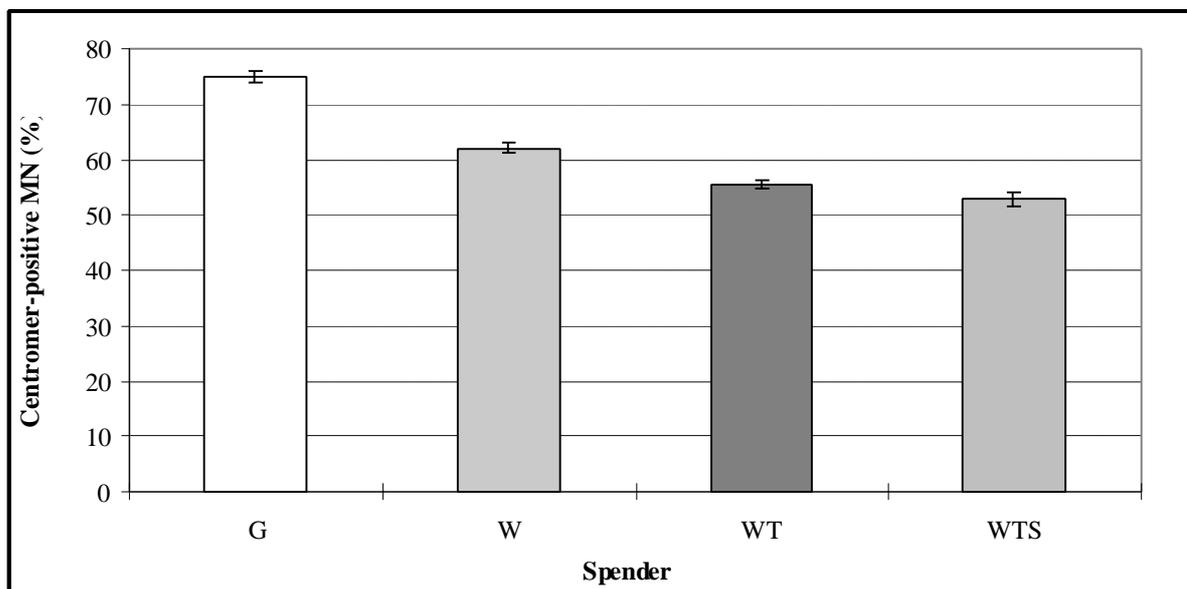
62,1% der Mikronuklei in Lymphocyten von Wismut-Arbeitern ohne Tumor enthielten Centromere (Tabelle 9). Dieser Wert ist signifikant niedriger ( $p < 0,0001$ ) als der entsprechende Wert bei gesunden Spendern (Abbildung 12). Ähnlich wie bei den gesunden Spendern beinhalteten die meisten Centromer-positiven Mikronuklei nur ein Signal.

**Tabelle 9: Centromer-positive Mikronuklei in unbestrahlten Lymphocyten der Wismut-Arbeiter ohne Tumor**

Spender	Mn	Mikronuklei mit n (0, 1, 2, 3, 4, 5) Signalen						MnC+	%MnC+	
		0	1	2	3	4	5			
W 88	104	35	47	19	3			69	66,35	
W 89	123	42	50	23	5	3		81	65,85	
W 90	100	36	38	23	2	1		64	64,00	
W 91	102	39	43	13	6	1		63	61,76	
W 92	110	40	51	12	5	2		70	63,64	
W 94	103	41	39	18	5			62	60,19	
W 95	116	51	46	15	3	1		65	56,03	
W 96	100	45	38	14	3			55	55,00	
W 97	104	40	45	16	3			64	61,54	
W 98	102	39	52	9	2			63	61,76	
W 99	104	40	40	16	4	4		64	61,54	
W 100	76	30	26	11	7	1	1	46	60,53	
W 102	101	34	42	17	6	1	1	67	66,34	
W 103	102	36	37	21	6	1	1	66	64,71	
S	1447	548	594	227	60	15	3	899	<b>Mw.:</b>	62,09

Die Centromer-Analysen der Mikronuklei von Wismut-Arbeitern mit Tumor haben gezeigt, daß 55,6% der Mikronuklei bei den Spendern ohne Strahlentherapie (WT) und 52,9% bei den Probanden nach der Strahlentherapie (WTS) Centromer-positiv waren.

Diese Werte sind signifikant niedriger nicht nur im Vergleich zu den Ergebnissen aus der Gruppe der gesunden Probanden (G) ( $p < 0,0001$ ), sondern auch gegenüber den Centromer-Auswertungen bei den Wismut-Arbeitern ohne Tumor (W) ( $p < 0,0001$ ) (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Centromer-positive Mikronuklei in unbestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender und Wismut-Arbeiter. Angegeben ist der Standardfehler vom Mittelwert (G: n=9; W: n=14; WT: n=23; WTS: n=8).**

In der Gesamtgruppe der Wismut-Arbeiter mit Tumor (WT und WTS) wiesen die meisten Centromer-positiven Mikronuklei nur ein Fluoreszenzsignal auf.

Die höchste Anzahl von Centromer-Signalen (5) wurde bei den Wismut-Arbeitern mit Tumor ohne Strahlentherapie beobachtet.

In der Tabelle 10 sind die individuellen Werte der Centromer-Auswertung bei Wismut-Arbeitern mit Tumor zusammengestellt.

**Tabelle 10: Centromer-positive Mikronuklei in unbestrahlten Lymphocyten der Wismut-Arbeiter mit Tumor**

**a) ohne Strahlentherapie**

Spender	Mn	Mikronuklei mit n (0, 1, 2, 3, 4, 5) Signalen						MnC+	%MnC+
		0	1	2	3	4	5		
WT 3	133	59	39	19	12	4		74	55,64
WT 6	123	49	42	25	5	1	1	74	60,16
WT 7	110	49	41	15	5			61	55,45
WT 9	102	44	39	18	1			58	56,86
WT 10	103	45	41	16	1			58	56,31
WT 11	106	55	38	12	1			51	48,11
WT 12	101	46	31	22	2			55	54,46
WT13	105	47	39	18	1			58	55,24
WT 16	102	43	43	15		1		59	57,84
WT 24	109	45	46	16	2			64	58,72
WT 30	115	56	43	15		1		59	51,30
WT 33	110	54	38	15	2	1		56	50,91
WT48	101	43	36	21		1		58	57,43
WT 55	114	48	51	14		1		66	57,89
WT 57	104	44	39	18	3			60	57,69
WT 58	105	45	42	14	4			60	57,14
WT 59	104	45	34	24	1			59	56,73
WT 60	110	50	43	15	2			60	54,55
WT 61	107	42	42	19	2	2		65	60,75
WT 62	103	44	36	19	4			59	57,28
WT 63	103	48	46	7	1	1		55	53,40
WT 66	103	53	33	15	1	1		50	48,54
WT 67	105	45	42	15	2	1		60	57,14
S	2478	1099	924	387	52	15	1	1379	<b>Mw.:</b> 55,63

**b) nach Strahlentherapie**

Spender	Mn	Mikronuklei mit n (0, 1, 2, 3, 4, 5) Signalen						MnC+	%MnC+
		0	1	2	3	4	5		
WTS 2	123	61	42	16	4			62	50,41
WTS 5	115	50	37	26	1	1		65	56,52
WTS 8	107	48	39	15	5			59	55,14
WTS 14	103	50	27	25	1			53	51,46
WTS 15	102	46	41	14	1			56	54,90
WTS 56	106	56	29	20	1			50	47,17
WTS 64	102	44	33	21	3	1		58	56,86
WTS 65	109	54	41	13		1		55	50,46
S	867	409	289	150	16	3	0	458	Mw.: 52,86

### 3.3.2 Centromer-positive Mikronuklei in bestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender

Im Hinblick auf die Ermittlung der Dosiswirkungsbeziehung von Centromerpositiven Mikronuklei wurde das Blut von gesunden Spendern mit verschiedenen Dosen Röntgenstrahlen bestrahlt.

Tabelle 11 stellt die Verteilung der Centromer-Signale in Mikronuklei der gesunden Probanden dar. Ähnlich wie bei unbestrahlten Lymphocyten wurden bis zu 5 Signale in einem Mikronukleus beobachtet.

**Tabelle 11: Centromer-positive Mikronuklei in bestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender**

#### a) 0,10 Gray

Spender	Mn	Mikronuklei mit n (0, 1, 2, 3, 4, 5) Signalen						MnC+	%MnC+
		0	1	2	3	4	5		
G 1	131	45	63	17	4	2		86	65,65
G 2	116	38	63	10	5			78	67,24
G 3	132	36	62	31	3			96	72,73
G 4	102	33	37	15	16	1		69	67,65
G 5	110	34	48	18	6	4		76	69,09
G 6	103	34	49	19		1		69	66,99
G 7	109	32	56	19	1	1		77	70,64
G 8	105	34	57	13	1			71	67,62
G 9	109	36	53	15	3	2		73	66,97
S	1017	322	488	157	39	11	0	695	Mw.: 68,29

#### b) 0,30 Gray

Spender	Mn	Mikronuklei mit n (0, 1, 2, 3, 4, 5) Signalen						MnC+	%MnC+
		0	1	2	3	4	5		
G 1	100	46	53	1				54	54,00
G 2	121	44	50	19	3	3	2	77	63,64
G 3	106	39	35	23	5	4		67	63,21
G 4	107	40	37	23	5	1	1	67	62,62
G 5	124	49	47	23	4	1		75	60,48
G 6	113	47	47	17	2			66	58,41
G 7	108	37	49	20	2			71	65,74
G 8	109	41	49	15	2	2		68	62,39
G 9	109	42	47	17	2	1		67	61,47
S	997	385	414	158	25	12	3	612	<b>Mw.:</b> 61,33

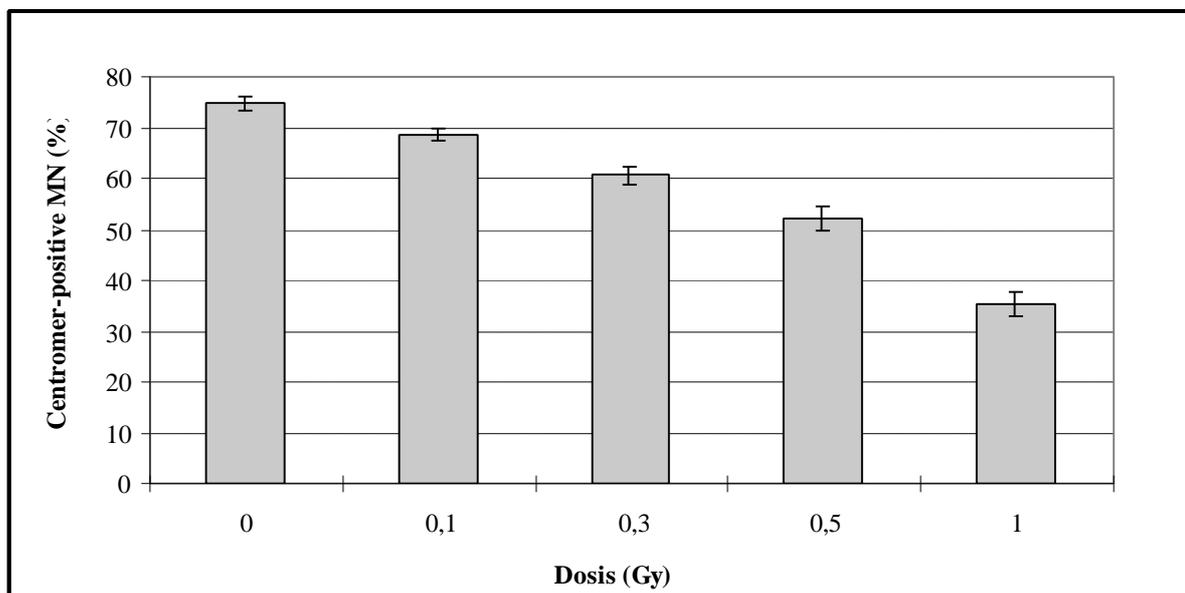
## c) 0,50 Gray

Spender	Mn	Mikronuklei mit n (0, 1, 2, 3, 4, 5) Signalen						MnC+	%MnC+
		0	1	2	3	4	5		
G 1	133	77	36	13	4	3		56	42,11
G 2	175	97	65	10	2	1		78	44,57
G 3	162	73	65	20	4			89	54,94
G 4	170	81	49	31	4	5		89	52,35
G 5	133	66	27	26	12	2		67	50,38
G 6	113	54	46	11	2			59	52,21
G 7	106	42	42	20	1	1		64	60,38
G 8	113	49	44	16	2	2		64	56,64
G 9	114	51	47	12	2	2		63	55,26
S	1219	590	421	159	33	16	0	629	<b>Mw.:</b> 52,09

## d) 1,00 Gray

Spender	Mn	Mikronuklei mit n (0, 1, 2, 3, 4, 5) Signalen						MnC+	%MnC+
		0	1	2	3	4	5		
G 1	100	69	31					31	31,00
G 2	195	138	44	13				57	29,23
G 3	161	97	41	17	6			64	39,75
G 4	185	115	37	28	4	1		70	37,84
G 5	153	92	32	18	9	1	1	61	39,87
G 6	131	84	36	9		2		47	35,88
G 7	142	89	39	13		1		53	37,32
G 8	133	89	30	13	1			44	33,08
G 9	134	90	38	5	1			44	32,84
S	1334	863	328	116	21	5	1	471	<b>Mw.:</b> 35,20

Dosisabhängig nahm die relative Anzahl der Centromerpositiven Mikronuklei ab. Nach einer Dosis von 0,1 Gy enthielten 68,3% der Mikronuklei Centromere. Es wurde maximal ein Fluoreszenzsignal beobachtet. Die höheren Bestrahlungsdosen bewirkten eine relative Abnahme der Centromer-positiven Mikronuklei. Nach 0,3 Gy Röntgenstrahlen wurden 61,3% der Mikronuklei mit Centromer-Signalen beobachtet. Eine weitere Abnahme Centromerhaltiger Mikronuklei wurde nach 0,5 Gy und 1 Gy ermittelt. Nach 0,5 Gy waren 52,1% der Mikrokerne Centromer-positiv und nach 1 Gy fiel die Häufigkeit der Centromerpositiven Mikronuklei auf weniger als 50% (Tabelle 11, Abbildung 13).



**Abbildung 13: Centromer-positive Mikronuklei in Lymphocyten der gesunden Spender nach in vitro Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. Angegeben ist der Standardfehler vom Mittelwert (G: n=9).**

### 3.3.3 Statistische Kombination der Ergebnisse des Mikronukleustestes und der Centromer-Analyse bei gesunden Spendern

Um die Empfindlichkeit des biologischen Dosimeters im Bereich niedriger Strahlendosen weiter zu erhöhen, wurde der Versuch unternommen, die aus dem Mikronukleustest und aus dem Mikronukleus-Centromertest ermittelten p-Werte miteinander zu kombinieren. Diese Analyse wurde auf die Daten nach 0,10 Gy konzentriert. Die Ergebnisse wurden in der Tabelle 12 zusammengestellt. Im Mikronukleustest oder Mikronukleus-Centromertest allein wurde bei keinem der Spender ein signifikanter Unterschied zwischen 0 und 0,1 Gy beobachtet. Eine Kombination beider Tests ergab einen signifikanten Unterschied bei 6 aus 9 Spendern.

**Tabelle 12: Statistische Zusammenfassung der Ergebnisse des Mikronukleustestes und der Centromer-Analysen bei gesunden Spendern (\* = Unterschied signifikant zur Kontrolle)**

Spender	Dosis (Gy)	Signifikanz			p
		Mn	Mn C+	Mn - MnC+	
<b>G 1</b>	0,1	0,427	0,0282	0,0120	p<0,05*
	0,3	0,3492	0,0003	0,0001	p<0,001*
<b>G 2</b>	0,1	0,0501	0,0871	0,0044	p<0,01*
	0,3	0,0096	0,0153	0,0001	p<0,001*
<b>G 3</b>	0,1	0,0735	0,2979	0,0219	p<0,05*
	0,3	0,0029	0,0111	0,0000	p<0,0001*
<b>G 4</b>	0,1	0,0742	0,4667	0,0346	p<0,05*
	0,3	0,0157	0,122	0,0019	p<0,01*
<b>G 5</b>	0,1	0,1868	0,4504	0,0841	p>0,05
	0,3	0,0253	0,0345	0,0009	p<0,001*
<b>G 6</b>	0,1	0,6355	0,6601	0,4195	p>0,05
	0,3	0,0639	0,0935	0,0060	p<0,01*
<b>G 7</b>	0,1	0,0081	0,3519	0,0029	p<0,01*
	0,3	0,0016	0,0951	0,0002	p<0,001*
<b>G 8</b>	0,1	0,2676	0,6555	0,1754	p>0,05
	0,3	0,0001	0,1948	0,0000	p<0,0001*
<b>G 9</b>	0,1	0,0093	0,2898	0,0027	p<0,01*
	0,3	0,016	0,0551	0,0009	p<0,001*

### 3.4 Analyse von Chromosomenaberrationen

Die Analyse von Chromosomenaberrationen in unbestrahlten Lymphocyten wurde als eine erweiterte Untersuchung chromosomaler Schäden angewendet. Für diesen Nachweis wurden

aus kultivierten Lymphocyten der gesunden Spender und Wismut-Arbeiter mit Tumor Metaphaseplatten hergestellt und die Aberrationstypen und deren Häufigkeiten bestimmt

### 3.4.1 Proliferationsrate in Lymphocyten

Es wurden zwei Parameter, die die Proliferation charakterisieren, bestimmt:

a./ Mitose-Index (Prozent der Zellen die sich in der Metaphase befinden)

b./ Prozentualer Anteil der Zellen in der zweiten Mitose (M II)

In den Abbildungen 14, 15 und 16 wurden die Ergebnisse zusammengestellt. Der Mitose-Index der gesunden Spender lag im Durchschnitt bei 10%. In Lymphocyten der Wismut-Arbeiter mit Tumor ohne Strahlentherapie wurden im Mittelwert 8,6% der Zellen in der Mitose ermittelt. Bei den 3 strahlentherapierten Wismut-Arbeitern betrug dieser Wert nur 5,3%.

Die Proliferationswerte der Lymphocyten gesunder Spender, der Wismut-Arbeiter mit Tumor ohne Strahlentherapie und der Wismut-Arbeiter mit Tumor nach Strahlentherapie unterschieden sich statistisch voneinander.

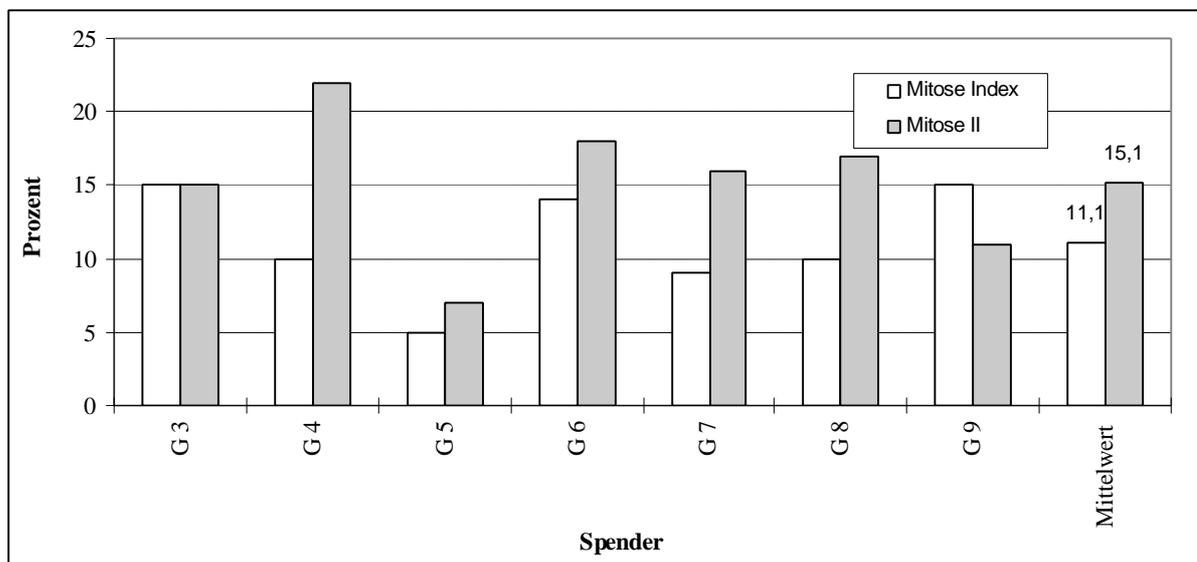
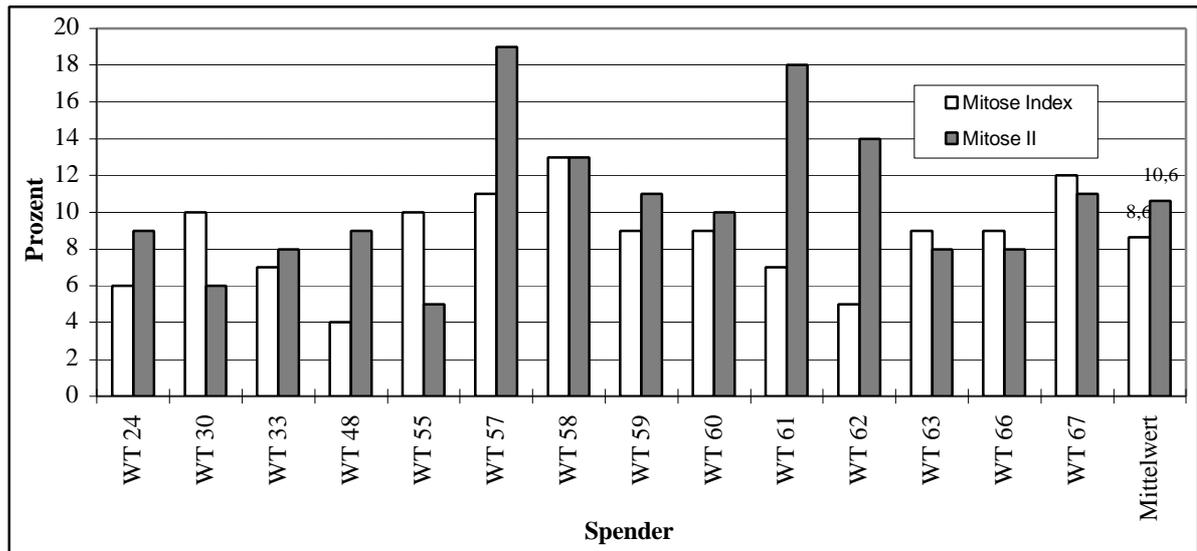
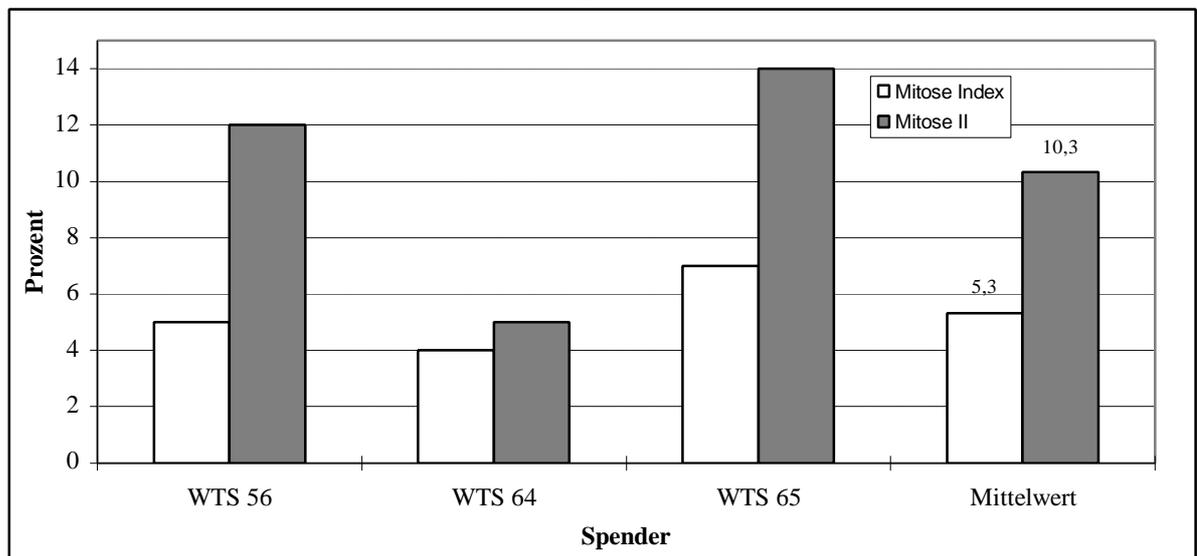


Abbildung 14: Proliferation der unbestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender

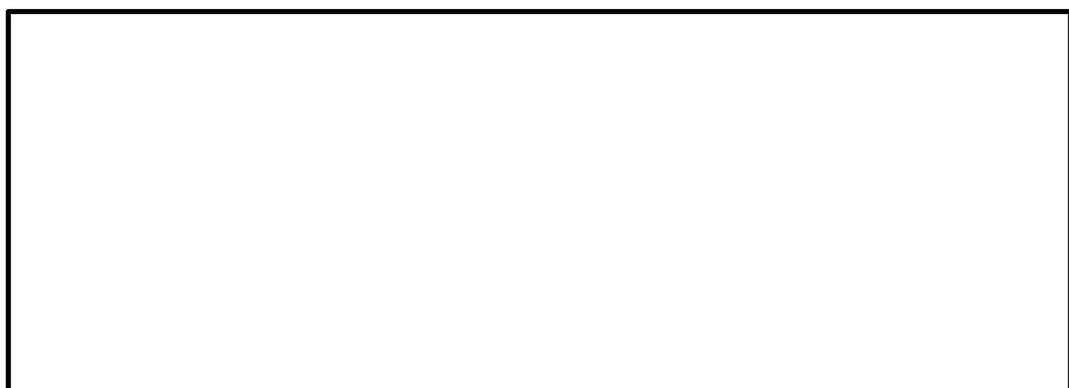


**Abbildung 15: Proliferation der unbestrahlten Lymphocyten der WismutArbeiter mit Tumor ohne Strahlentherapie**



**Abbildung 16: Proliferation der unbestrahlten Lymphocyten der WismutArbeiter mit Tumor nach Strahlentherapie (WTS: n=3)**

Eine zusätzliche Information über die Proliferation der Lymphocyten ergab die Bestimmung der Zellen in der zweiten Mitose. Durch die Zugabe von BrdU zu den Zellkulturen und der FPG- Färbung konnte mikroskopisch zwischen Zellen, die sich in der 1. Mitose bzw. 2. Mitose nach Stimulierung befanden, unterschieden werden.





**Bild 8: Metaphase-Chromosomen nach einer FPG-Färbung. Die Zelle befindet sich in der 2. Mitose (unterschiedlich gefärbte Schwesterchromatiden)**

In der Gruppe der gesunden Spender wurde im Mittel 15,1% aller sich teilenden Zellen in der zweiten Mitose gefunden (Abbildung 14). Ähnlich wie bei der Bestimmung der Mitose-Indices wiesen die Lymphocyten der Wismut-Arbeiter mit Tumor eine geringere Proliferation auf als die Lymphocyten der gesunden Spender.

### **3.4.2 Chromosomenaberrationen in unbestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender (G) und Wismut-Arbeiter mit Tumor (WT, WTS)**

Wie man der Tabelle 13 entnimmt, wurden in insgesamt 700 Metaphasezellen von gesunden Spendern 7 Chromosomen-Brüche (1%), 8 Chromatid-Brüche (1,1%) und 1 dizentrisches Chromosom (0,14%) beobachtet. Insgesamt wiesen 2,3% der Zellen Aberrationen auf.

**Tabelle 13: Chromosomenaberrationen in unbestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender**

Spender	n-Zellen	<u>Aberrations-Typ</u>			Summe der Aberrationen
		Chromosomen Bruch	Chromatiden Bruch	Dizentrisches Chromosom	

G 3	100	2			2
G 4	100		2		2
G 5	100		2	1	3
G 6	100		1		1
G 7	100	1	2		3
G 8	100	1	1		2
G 9	100	3			3
<b>S</b>	700	7	8	1	16
<b>Mw. auf 100 Zellen:</b>		1,00	1,14	0,14	2,28

In Lymphocyten der Wismut-Arbeiter mit Tumor (WT, n=14 und WTS, n=3) traten signifikant mehr Aberrationen auf als bei den gesunden Spendern. In den Tabellen 14 und 15 sind die Ergebnisse der Analysen zusammengestellt. Bei den WismutSpendern mit Tumor ohne Strahlentherapie wurden 11,2% und bei den WismutSpendern mit Tumor nach Strahlentherapie 17,3% der Zellen mit Aberrationen beobachtet. In der Gruppe der Wismut-Arbeiter mit Tumor ohne Strahlentherapie wurden in 6,9% Chromosomen-Brüche, in 2,6% Chromatid-Brüche und in 1,6% dizentrische Chromosomen ermittelt.

Die entsprechenden Werte bei den Wismut-Arbeitern mit Tumor nach Strahlentherapie betragen 9,3%, 2% und 6%.

**Tabelle 14: Chromosomenaberrationen in unbestrahlten Lymphocyten der Wismut-Arbeiter mit Tumor ohne Strahlentherapie**

Spender	n-Zellen	<u>Aberrations-Typ</u>			Summe der Aberrationen
		Chromosomen Bruch	Chromatiden Bruch	Dizentrisches Chromosom	
WT 24	100	4	2	2	8
WT 30	100	11	3	3	17
WT 33	100	14	4	1	19
WT 48	100	7	4	2	13
WT 55	100	6	3	1	10
WT 57	100	4	1	1	6
WT 58	100	7	2	1	10
WT 59	100	8	4	1	13
WT 60	100	7		3	10
WT 61	100	6	1	2	9
WT 62	100	3	3	3	9
WT 63	100	5	3	3	11
WT 66	100	7	5		12
WT 67	100	8	2		10

S	1400	97	37	23	157
<b>Mw. auf 100 Zellen:</b>		6,93	2,64	1,64	11,21

**Tabelle 15: Chromosomenaberrationen in unbestrahlten Lymphocyten der Wismut-Arbeiter mit Tumor nach Strahlentherapie**

Spender	n-Zellen	<u>Aberrations-Typ</u>			Summe der Aberrationen
		Chromosomen Bruch	Chromatiden Bruch	Dizentrisches Chromosom	
WTS 56	100	14	3	12	29
WTS 64	100	9	1		10
WTS 65	100	5	2	6	13
S	300	28	6	18	52
<b>Mw. auf 100 Zellen:</b>		9,33	2,00	6,00	17,33

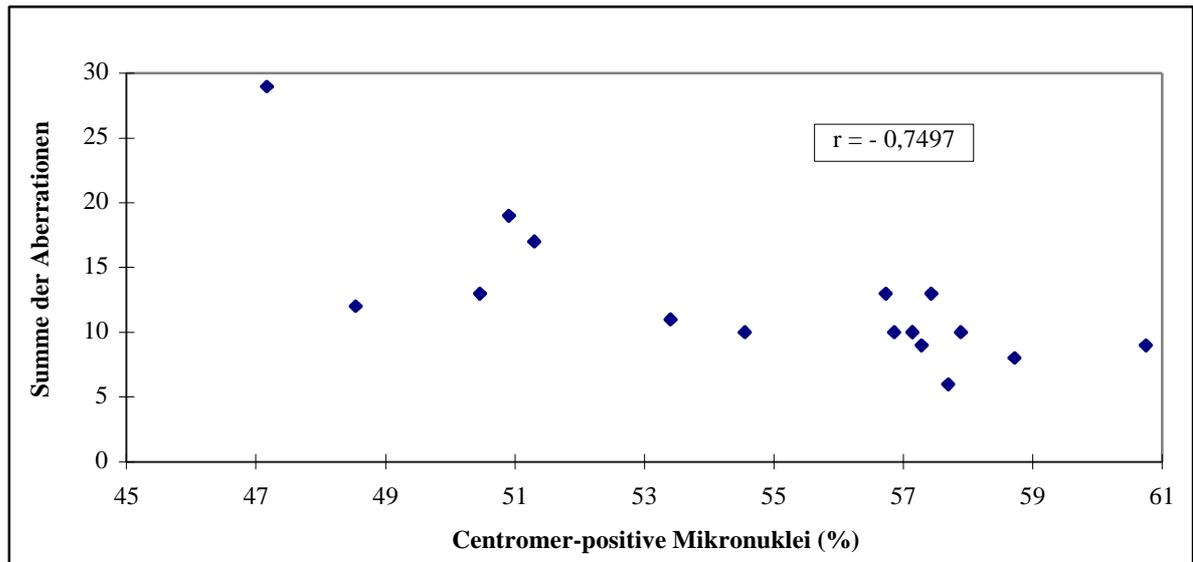
Die Aberrationshäufigkeit in Lymphocyten der Wismut-Arbeiter mit Tumor war signifikant höher als in den Lymphocyten gesunder Spender (G und WT- $p < 0,05$  G und WTS- $p < 0,01$ ).

### 3.4.3 Korrelation zwischen Mikronukleushäufigkeit und Chromosomenaberrationen

Es wurden keine Korrelationen zwischen den Mikronukleushäufigkeiten und den Chromosomenaberrationen bei gesunden Spendern und Wismut-Arbeitern mit Tumor ermittelt.

### 3.4.4 Korrelation zwischen Centromerpositiven Mikronuklei und Chromosomenaberrationen

Die Anzahl Centromer-positiver Mikronuklei und der Chromosomenaberrationen bei 17 Wismut-Arbeitern mit Tumor korrelierten dagegen gut miteinander (Abbildung 17). Mit steigender Häufigkeit von Chromosomenaberrationen nahm der prozentuale Anteil der Mikronuklei mit Centromeren ab.



**Abbildung 17: Korrelation zwischen Centromerpositiven Mikronuklei und Chromosomenaberrationen in Lymphocyten der WismutArbeiter mit Tumor**

## 4. Diskussion

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Möglichkeiten des Mikronukleustestes für die „biologische Dosimetrie“ (biologischer Indikator) zu testen und zu erweitern. Es ging insbesondere um die Möglichkeit der Verwendung des Testes als quantitativer Indikator nach Strahlenschäden im niedrigen Dosisbereich bis zu 0,5 Gy. Die Steigerung der Empfindlichkeit des Mikronukleustestes im niedrigen Dosisbereich wurde durch den Einsatz von Centromer-spezifischen Sonden erzielt, wobei der Inhalt der Mikronuklei (ob azentrische Fragmente oder ganze Chromosomen) bestimmt wurde. Da man sich von der Etablierung des Mikronukleustestes eine Alternative bzw. Ergänzung zur traditionellen Untersuchung der Metaphasechromosomen erhofft, sollten die durchgeführten Untersuchungen der Chromosomenaberrationen dazu dienen, eine bessere Charakterisierung der Aberrationen, die zur Mikronuklei führen, zu erhalten.

### 4.1 Randbedingungen des Mikronukleustestes

Die Untersuchungen zu den Randbedingungen des MikronukleusAssays sind von Wuttke (1993, Dissertation) durchgeführt worden. Es wurden unter anderem der Einfluß der Zelldichte auf die Mikronukleus-Expression und Proliferation von Lymphocyten, sowie die Veränderung der Zellproliferation nach Zugabe von PHA vor und nach der Bestrahlung analysiert.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß eine reproduzierbare Proliferation und Mikronukleus-Expression dann erzielt wurde, wenn die Zelldichte  $1-2 \times 10^5$ /ml Medium betrug. Daher wurde im Rahmen unserer Analysen darauf geachtet, daß die Lymphocyten-dichte bei allen angesetzten Kulturen innerhalb dieses Bereiches lag.

Die von Schrek und Stefani (1964) und Stewart et al. (1988) beschriebene strahlenbedingte Beeinflussung der Zellproliferation durch PHA wurde ebenfalls durch Wuttke (1993) überprüft. Es zeigte sich, daß die Mikronukleusfrequenzen höher waren, wenn die Lymphocyten vor der Stimulierung bestrahlt wurden als dann, wenn die Bestrahlung nach der Stimulierung stattfand.

Um diesen Effekt zu verhindern, wurden in unseren Untersuchungen die Lymphocyten zuerst in vitro mit Röntgenstrahlen bestrahlt und dann PHA stimuliert.

## 4.2 Proliferation der Lymphocyten

Eine Voraussetzung für die Mikronukleusexpression ist die Zellkernteilung (Müller et al 1991). Da sich die Lymphocyten in der G<sub>0</sub>-Phase befinden, müssen sie mit einem Mitogen, PHA, stimuliert werden. Nach dem Standardprotokoll für den MikronukleusAssay (Fenech und Morley, 1985a,b) wird Cytochalasin B 44 Stunden nach Beginn der Kultur hinzugegeben. In unseren Untersuchungen erwies sich dieser Zeitpunkt als optimal sowohl für die Lymphocyten der gesunden Spender als auch der Wismut-Arbeiter. Es ist bekannt, daß die Lymphocytenproliferationsraten nach der Stimulierung mit PHA starke interindividuelle Schwankungen aufweisen (Fenech und Morley, 1985b). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen dies: in den unbestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender schwankte die Proliferationsrate zwischen 22,1 und 36,2%, bei Wismut-Arbeitern ohne Tumor zwischen 12,7 und 33,8% und in der Gruppe der Wismut-Arbeiter mit Tumor zwischen 3,8 und 30,5%. Lymphocyten stellen eine aus mehreren Subpopulationen bestehende Zellpopulation dar (Högstedt et al., 1988a, b; Wuttke et.al., 1993). Der Anteil der einzelnen Subpopulationen am gesamten Lymphocytenpool ist wiederum von vielen Faktoren abhängig, wie z.B. Alter, Qualität des Immunsystems und Medikation. Die von uns untersuchten Spender waren zwischen 30 und 76 Jahre alt. Bei den jüngsten Spendern aus der Kontrollgruppe (G1, 30 J.-34,4%; G2, 31 J.-36,9%) wurde die höchste Proliferationsrate ermittelt, mit höherem Alter nahm sie ab (G4, 63J.-25,9%; G7, 73 J.-24,8%; G8, 60 J.-22,1%).

Die Altersabhängigkeit der Proliferation wurde am deutlichsten in den beiden Gruppen der Wismut-Spender beobachtet (die Altersbandbreite beider Spendergruppen war gleich: W lag zwischen 59 und 71 J., WT+WTS lag zwischen 61 und 76 J.). Hier wurden die niedrigsten Proliferationsraten ermittelt. Die meisten von den ehemaligen Wismut-Arbeitern (insbesondere Tumorpatienten) erhielten nicht nur im Rahmen der Tumorthherapie verschiedene Arzneimittel. Wie erwartet steigt mit dem Alter die Wahrscheinlichkeit einer altersbedingten Erkrankung (z.B. Diabetes mellitus, Herzrhythmusstörungen) und damit die dauerhafte Einnahme von Medikamenten.

Einige der Wismut-Spender mit Tumor erhielten eine Strahlentherapie oder auch eine Chemotherapie. Die Patienten bekamen zusätzliche Medikamente, hauptsächlich Antibiotika und Antimykotika zur Infektionsprophylaxe. Bei einigen Antiemetika (z.B. Dexamethason sehr oft während der Strahlentherapie verabreicht) wurde eine antiproliferative Wirkung auf Lymphocyten sowie eine Induktion von Apoptose nachgewiesen (Bansal et.al., 1989). Die niedrigsten Proliferationsraten in unseren Untersuchungen wurden bei Spendern nach einer Strahlentherapie ermittelt. Eine häufig sehr geringe Rate an Binuklearisierung in den Lymphocyten infolge der Therapie von Leukämie-Patienten wurde von Migliore et.al., (1991) und Wuttke (1993) beobachtet. Eine zusätzliche Belastung für die proliferierenden Zellen stellt die in vitro Bestrahlung dar. Wie erwartet, nimmt der Anteil an binukleären Lymphocyten mit der steigenden Bestrahlungsdosis in jeder untersuchten Gruppe ab. Nach 2,5 Gy (einige Wismut-Spender mit Tumor) und 5 Gy Röntgenstrahlen (die ganze Gruppe von Wismut-Arbeitern ohne Tumor und die meisten Wismut-Spender mit Tumor) wurden die Zellen sehr beeinträchtigt, so daß eine Ermittlung der Binuklearisierung in einer Reihe von Fällen nicht mehr möglich war. Erhöht sich die antiproliferative Wirkung der Bestrahlung durch zusätzliche Faktoren, so erscheint es nicht zulässig, nach dem von Fenech und Morley beschriebenen Standardprotokoll zu verfahren. Nach der Verlängerung der Zellkulturdauer bis zu 90 Stunden bei Brustkrebs-Patientinnen, wurde eine Erhöhung der Anzahl von binukleären Lymphocyten bis zu 63% beobachtet (Scott et. al., 1998). Um die Cytokinese durch Cytochalasin B zu einem dem Verlauf des Zellzyklus entsprechend geeigneten Zeitpunkt zu inhibieren, ist die Beobachtung der Lymphocyten-Proliferation während der Kulturdauer erforderlich (Gantenberg et.al., 1991; Wuttke et al., 1993).

#### **4.3 Dosiswirkungbeziehung der Mikronukleusfrequenz nach in vitro Bestrahlung der Lymphocyten**

Die Einführung der Cytochalasin B-Methode (Fenech und Morley, 1985a, b) löste zahlreiche Studien aus mit dem Ziel, eine in vitro Dosiswirkungsbeziehung zu erstellen, die die Abhängigkeit der Mikronukleusexpression von der Strahlendosis am besten beschreibt (Prosser et.al. 1988, Littlefield et. al.1989, Gantenberg et.al. 1991, Wuttke et.al. 1991, Thierens et. al. 1991, Vral et.al. 1992, 1994a, Verhaegen und Vral 1994). Die meisten Autoren wählten für die Anpassung der Dosiswirkungsbeziehung ein linear-quadratisches Modell. Bereits im Jahre

1942 postulierten Lea und Catcheside, daß die durch mit niedrigem LET-Strahlen induzierten Chromosomenaberrationen durch folgende linear-quadratische Dosiswirkungsbeziehung beschrieben werden können:

$$y = c + \alpha D + \beta D^2,$$

mit  $y$ -Gesamtzahl von Aberrationen,  $D$ -Dosis,  $c$ -Spontanrate von Aberrationen,  $\alpha$  und  $\beta$ -Koeffizienten.

Begründet wurde die linear-quadratische Beziehung durch die Annahme, daß ein Teil der Aberrationen (azentrische Fragmente) durch ein Trefferereignis (eine ionisierende Spurbahn), und ein anderer Teil (dizentrische Chromosomen) durch zwei Trefferereignisse (zwei voneinander unabhängige Spuren) induziert wird. Diesem Modell entsprechend zeigen azentrische Fragmente eine lineare und dizentrische Chromosomen eine linear-quadratische Dosiswirkungsbeziehung. Da strahleninduzierte Mikronuklei vorwiegend auf azentrische Fragmente zurückzuführen sind (Evans 1988; Weißenborn and Streffer 1991; Vral et al. 1997), könnte erwartet werden, daß ihre Dosiswirkungsbeziehung ebenfalls linear sei. Dies ist aber nicht so offensichtlich. Der Grund dafür könnte sein, daß andere Mechanismen für die Entstehung von Mikronuklei verantwortlich sein könnten, wie z.B. Schädigung des Kinetochors (Brenner et al. 1980), Schädigung des Spindelapparates (Maier und Schmidt 1976; Chai et al. 1985) oder multizentrische Chromosomen, an deren Centromeren die mitotischen Spindelfasern der gegenüberliegenden Pole so ansetzen, daß eine Bewegung der Chromatiden nicht möglich ist (Russell 1962). Aus diesem Grund scheint die Annahme einer quadratischen Komponente für die Strahlendosis erforderlich. Die meisten Autoren fügen deshalb im höheren Dosisbereich ( $>1$  Gy) der linearen eine quadratische Komponente hinzu (Kormos and Köteles 1988; Prosser et al. 1988; Littlefield et al. 1989; Thierens et al. 1991- für eine Übersicht Müller und Streffer 1993, Tab.2). Fenech and Morley (1985b) stellten dagegen eine lineare Dosiswirkungsbeziehung vor.

Die Anpassung der hier erhobenen Daten deutet auch auf ein linearquadratisches Modell:

$$Mn/Bn = 0,017 + 0,049 D + 0,075 D^2$$

Die von verschiedenen Autoren präsentierten Dosiswirkungskurven zeigen deutliche Unterschiede. Für die große Variabilität waren die Laborunterschiede verantwortlich z.B. Verwendung von unterschiedlichen Medien, PHA-Qualität für die Zellkultivierung, unterschiedliche Cytochalasin B-Konzentrationen, aber auch die Anzahl der untersuchten Probanden und Zellen war unterschiedlich. Andererseits führten zusätzliche Faktoren wie z.B. interindividuelle Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit, aber auch intraindividuelle Schwankungen der Mikronukleusraten (Huber et al. 1992, Wuttke, 1993-Dissertation), bei der Dosiswirkungsbeziehung zu solchen Diskrepanzen.

Da es in unseren Untersuchungen grundsätzlich um die Steigerung der Empfindlichkeit des Mikronukleustestes im niedrigen Dosisbereich (bis 0,50 Gy) ging, wurde nur bei den gesunden Spendern eine Dosiseffektkurve (bis 2,50 Gy) hergestellt. Bei Wismut-Spendern wurden nur nach zwei Strahlendosen (2,50 und 5,00 Gy) die Mikronukleushäufigkeiten bestimmt

Die Dosiswirkungsbeziehung für die Mikronukleusexpression der in vitro exponierten Lymphocyten von 9 gesunden Spendern zeigte eine gute Übereinstimmung mit den Daten aus der Literatur (Wuttke et al. 1991). Bei Vral et al. (1997) wurden vergleichbare Mikronukleushäufigkeiten im niedrigen Dosisbereich (0,10 Gy 28,4; hier 26 Mn/1000Bn, 0,30 Gy 34,6; 33 Mn/1000Bn, 0,50 Gy 48,6; 59 Mn/1000Bn) beobachtet. Bei den höheren Dosen (1,00 und 2,00 Gy) weisen unsere Spender mehr Mikronuklei auf. In drei von uns untersuchten Gruppen (gesunde Spender-G, Wismut-Arbeiter ohne Tumor-W und Wismut-Arbeiter mit Tumor-WT) findet man keine signifikanten Unterschiede bei den spontanen Mikronukleushäufigkeiten. Allerdings tritt eine große, unterschiedliche Variabilität in den Mikronukleushäufigkeiten (gesunde Spender Faktor 2,5; Wismut-Spender ohne Tumor-Faktor 4,4; Wismut Probanden mit Tumor-Faktor 25,8) auf. Der Vergleich unserer Daten mit denjenigen anderer Autoren zeigt, daß ähnliche interindividuelle Variabilitäten in den Mikronukleusfrequenzen auch von den anderen Arbeitsgruppen gefunden werden; so ermittelten Huber et al. (1989) einen Variabilitätsfaktor (Spannbreite niedrigster/höchster Wert) von 6. Die in der Literatur beschriebenen Spontan-Mikronukleusfrequenzen zeigten eine Spannweite zwischen 4 Mikronuklei/1000 Binukleaten (Au et al. 1991) und 62 Mikronuklei/1000 Binukleaten (Huber et al. 1992); (für eine Übersicht siehe Müller und Streffer, 1993, Tabelle 1).

In der vierten von uns untersuchten Gruppe Wismut-Arbeiter mit Tumor nach Strahlentherapie-WTS (siehe Material und Methoden) wurden erhöhte spontane

Mikronukleusraten ermittelt. Diesen Effekt muß man wohl als Wirkung der Strahlentherapie sehen. Mehrere Studien haben sich mit der Kinetik der Entstehung und des Verlustes der Mikronuklei beschäftigt. In allen diesen Studien wurde betont, daß direkt nach Einwirkung eines Mittels die Mikronukleusraten steigen und später die Zahl an mikronukleushaltigen Zellen gleichmäßig abnimmt (Obe und Beek 1975; Obe et al. 1975a; Roberts et al. 1986; Rithidech et al. 1988; Ono et al. 1990; Jagetia et al. 1990; Fenech et al. 1990). Einige Jahre nach Exposition mit verschiedenen Wirkstoffen wurden erhöhte Mikronukleusfrequenzen in Erythroblasten (Fliedner et al. 1964; Tanaka et al. 1984) und in Lymphocyten (Reddy et al. 1980; Fenech et al. 1990, Osanto et al. 1991) beobachtet, die dann aber auch reduziert wurden. Der Verlust der infolge einer Strahlentherapie entstandenen Mikronuklei kann bei Erwachsenen nach einem Jahr bis zu 41% (Reddy et al. 1980), bzw. 50% Mikronuklei (Fenech et al. 1990) bedeuten. Die Autoren beschreiben aber eine große Variabilität hinsichtlich des Verlustes der Mikronuklei nach einer Therapie. Bei den Kindern mit Schilddrüsentumoren nach  $^{131}\text{I}$  Therapie bilden sich solche Mikronuklei in 46 Monaten zurück (Streffer et al. 1998).

Große interindividuelle Schwankungen für die strahleninduzierten Mikronuklei wurden in verschiedenen Labors beobachtet, z.B. Huber et al. (1989) fanden nach Bestrahlung mit 3 Gy Unterschiede um einen Faktor 2,5. Auch unsere Untersuchungen bestätigen diese Variabilität: Nach der in vitro Bestrahlung der Lymphocyten mit 2,50 Gy Röntgenstrahlen, wurden bei gesunden Spendern Unterschiede vom Faktor 1,8, bei Wismut-Spender ohne Tumor (W)-4,8, bei Wismut-Spender mit Tumor (WT)-2,2 und bei WTS-1,6 ermittelt. Nach 5 Gy in der WT-Gruppe unterscheiden sich die Mikronukleushäufigkeiten um den Faktor 2,2 und in der WTS-Gruppe um 1,7.

Eine interindividuelle Schwankungsbreite wurde ebenfalls von Bender et al. (1988) für die Spontanfrequenzen von dizentrischen Chromosomen (0,2,8/1000 Zellen) und von Kakati et al. (1986) für die strahleninduzierten dizentrischen Chromosomen (Faktor 4 nach Exposition mit 3,00 Gy Gamma-Strahlung) beschrieben.

Das Auftreten der Variabilität vor allem in den spontanen Mikronukleusfrequenzen derselben Personen zu verschiedenen Zeitpunkten (Wuttke, 1993, Dissertation) stellt ein wichtiges Problem für die biologische Dosimetrie im niedrigen Dosisbereich dar.

Zusätzlich zu der individuellen kommt eine interindividuelle Schwankung, die nicht unbedingt auf eine heterogene Strahlenempfindlichkeit der untersuchten Personen zurückzuführen ist. Viele Autoren versuchten die breite Variabilität innerhalb der spontanen

Mikronukleusfrequenzen mit verschiedenen Faktoren, die durch den individuellen Lebensstil bzw. Lebensumstände auftreten, zu korrelieren. Am häufigsten wird die Altersabhängigkeit der spontanen Mikronukleusexpressionen beschrieben. Fenech und Morley berichteten einen altersbedingten Anstieg der spontanen Mikronukleushäufigkeiten sowohl beim konventionellen Mikronukleustest (1985c) als auch unter Verwendung der Cytochalasin B Methode (1986). In der letzteren Arbeit wurde ein Anstieg von 4,3% pro Jahr beschrieben. Ähnliche Effekte beobachteten Hall und Wells (1988) 2% pro Jahr, Scarfi et al. (1990), Yager (1990), Au et al. (1991) und Thierens et al. (1991). Huber et al. (1989) fanden einen signifikanten, altersabhängigen Anstieg an spontanen Mikronukleusfrequenzen beim konventionellen Mikronukleustest (3,4% pro Jahr), aber einen nicht signifikanten beim Mikronukleustest mit Cytochalasin B-Technik (2,2% pro Jahr). Für alkoholische Getränke, sowie Koffein innerhalb der untersuchten Konzentrationsbereiche wurden keine signifikanten Effekte hinsichtlich der spontanen Mikronukleusfrequenz festgestellt (Yager et al. 1990). Allerdings fanden Pylkkanen und Salonen (1987) einen Einfluß einer 5wöchigen „Ethanol-Diät“ auf erhöhte Mikronukleusraten nach 0,5 Gy Bestrahlung männlicher Keimzellen bei der Maus. Ein signifikanter Anstieg der spontanen Mikronukleusfrequenzen (Larramendy und Knuutila, 1991) bzw. kein Unterschied (Huber et al. 1989, Nordic Study Group 1990, Yager et al. 1990, Au et al. 1991) wurde beim Rauchen von Zigaretten berichtet. Für diagnostische Röntgenstrahlen (Yager 1990), sowie Kontrastmittel (Norman et al. 1984) wurde ein signifikanter Effekt hinsichtlich der Mikronukleusfrequenzen festgestellt.

#### **4.4 Empfindlichkeit des Mikronukleustestes im niedrigen Dosisbereich**

Die oben beschriebene Variabilität, hauptsächlich der Spontanhäufigkeit von Mikronuklei in binukleären Lymphocyten, stellt ein großes Problem im niedrigen Dosisbereich dar. Die von Fenech und Morley (1986) sehr optimistisch dargestellte Dosisabschätzung mit dem Cytochalasin-B Mikronukleustest, daß sogar eine Exposition von 0,05 Gy detektierbar sei, kann nach Prosser et al. (1988) nur dann erzielt werden, wenn der individuelle Kontrollwert (Mikronukleusrate vor Exposition) bekannt ist. Unsere Daten bestätigen die Beobachtungen von Prosser et al. (1988). Die kleinste in unseren Untersuchungen eingesetzte Dosis (0,1 Gy) kann man mit dem Mikronukleustest nur auf dem Populationsniveau ermitteln. Ohne Kenntnis der Mikronukleusraten der einzelnen Spender vor der in vitro Exposition, ist es nicht möglich,

die Bestrahlungsdosis im niedrigen Dosisbereich (bis 0,5 Gy) zu erfassen. Einigen Autoren (Evans et al. 1979; Llyod et al. 1980) gelang die Detektion sehr niedriger Dosen unter vertretbarem Zeitaufwand nur in exponierten Populationen, nicht jedoch in exponierten Individuen.

Als untere Nachweisgrenze einer individuellen Strahlenexposition mit dem Cytochalasin-B Mikronukleustest wurde in der Literatur 0,1 Gy (Prosser et al. 1988), 0,3 Gy (Thierens et al. 1991) bzw. 0,2 Gy (Huber et al. 1992) angegeben. Aufgrund der niedrigen Spontanrate an dizentrischen Chromosomen wird ein Nachweis mit Hilfe dieses Indikators bis zu 0,05 Gy von einigen Autoren angenommen (Lloyd et al. 1986), andere Autoren (Kormos und Köteles 1990) fanden eine vergleichbare Nachweisgrenze für beide Systeme.

#### **4.4.1 Lymphocyten Subpopulationen**

Ein weitere Ursache für die große Variabilität besteht darin, daß bei der Auswertung nicht zwischen Lymphocyten subpopulationen, die unterschiedlich strahlenempfindlich sein können, differenziert wurde (Högstedt et al., 1988a; Wuttke et al., 1993). Im allgemeinen wurde beobachtet, daß sich B-Lymphocyten radiosensitiver verhalten als T-Lymphocyten. Es wurde auch eine hohe Strahlenempfindlichkeit für die T-Suppressor-Population (T-Zellen) festgestellt (Prosser et al., 1976; Schwartz et al., 1980, 1983; Wassermann et al., 1981; van Rensburg et al., 1985; Sieber et al., 1985; Stewart et al., 1988).

Die Strahlenempfindlichkeit einer Person wird durch die zum Zeitpunkt der Untersuchung bestehende Zusammensetzung der Gesamt-Lymphocyten wesentlich mitbestimmt. Die zahlreichen Einflußmöglichkeiten auf die Zusammensetzung des Lymphocytenpools scheinen auch durch standardisierte Untersuchungsbedingungen nicht ausgleichbar zu sein. Viele Autoren beschreiben, daß sich die Subpopulationenzusammensetzung der Lymphocyten in Abhängigkeit vom Alter und vom Geschlecht (Ohta et al., 1986), durch Vorerkrankungen (Kus et al., 1985) der untersuchten Person, sowie durch die Tageszeit (Signore et al., 1985) verändert.

Die ersten Hinweise auf eine höhere Mikronukleusexpression in B-Zellen nach Bestrahlung kam von Högstedt et al. (1988b), wo eine höhere strahleninduzierte Mikronukleusfrequenz nach PWM (Pokeweed Mitogen)-Stimulation (stimuliert bevorzugt B-Zellen) als nach PHA-

Stimulation (stimuliert bevorzugt T-Zellen), gefunden wurde. Larramendy und Knuutila (1991) beschreiben eine erhöhte Mikronukleusrate in B-Zellen von Rauchern und für Peplomycin wurde ein stärkerer Effekt auf die Mikronukleus-Induktion in B-Zellen als in T-Zellen gezeigt (Slavutsky und Knuutila, 1989). Wuttke et al., (1993) sehen eine Notwendigkeit, induzierte Mikronukleusfrequenzen unter Beachtung des mit dem Verhalten der Proliferation der zu untersuchenden Zellpopulation nach Bestrahlung zu bewerten. Aufgrund der hohen Sensitivität der B-Zellen gegenüber der Bestrahlung mit hohen Dosen (>1 Gy) führt die Dosisabschätzung mit Hilfe der Mikronukleusbestimmung in dieser Subpopulation zu einer enormen Unterschätzung der absorbierten Dosis (Wuttke et al., 1993). Nach einer Strahlenexposition zwischen 0,5 und 1 Gy (in der Studie von Wuttke et al., 1993) blieb die Proliferation der B-Zellen und T-Zellen unbeeinträchtigt, so daß sich die induzierte Mikronukleusfrequenz für beide Subpopulationen als ein geeignetes Maß für die Bestimmung ihrer Strahlenempfindlichkeit in diesem Bereich darstellte. Dabei zeigte sich, daß die B-Zellen in diesem Dosisbereich empfindlicher waren (nach einer Exposition mit 0,5 Gy betrug die Mikronukleusrate das 2,5fache der in den T-Zellen detektierten Dosis).

#### **4.4.2 Steigerung der Empfindlichkeit des Mikronukleustestes durch den Centromernachweis mit FISH-Sonden**

Ein Ziel unserer Untersuchungen war die Überprüfung, ob die Sensitivität des Mikronukleustestes gegenüber Strahlung durch den Einsatz von centromerspezifischen FISH-Sonden gesteigert werden kann.

Der Mikronukleustest gehört zu den am häufigsten angewendeten Tests in der biologischen Dosimetrie (Müller und Streffer, 1991; 1994). Im Vergleich zu den Chromosomenaberrationen ist die Auswertung von Mikronuklei relativ schnell und einfach. Lange Zeit war es allerdings nicht möglich, zwischen Mikronuklei zu unterscheiden, die aufgrund von clastogener oder aneuploider Wirkung von Agenzien induziert werden. Es wurde zunächst versucht, durch den Einsatz der CREST Antikörper, dieses Problem zu lösen (Degrassi und Tanzarella, 1988; Fenech und Morley, 1989; Weissenborn und Streffer, 1991). Eine weitere Entwicklung stellte die Einführung der in situ-Hybridisierungstechnik mit DNA-Sonden gegen Centromere dar (Becker et al., 1990). Beide Techniken ermöglichen eine Unterscheidung zwischen Mikronuklei, die ganze Chromosomen oder azentrische Fragmente enthalten. In zahlreichen

Studien wurde gezeigt, daß Aneuploidie-induzierende Agenzien Mikronuklei hervorrufen, die Centromer- bzw. CREST positiv sind, also ganze Chromosomen enthalten. Im Gegensatz dazu induzieren clastogene Agenzien überwiegend Mikronuklei mit azentrischen Fragmenten (Eastmond und Tucker, 1989; Salassidis et al., 1992, Weissenborn und Streffer, 1991; Müller und Nüsse, 1993; Darroudi et al., 1996; Huber et al., 1996; Schuler et al., 1997).

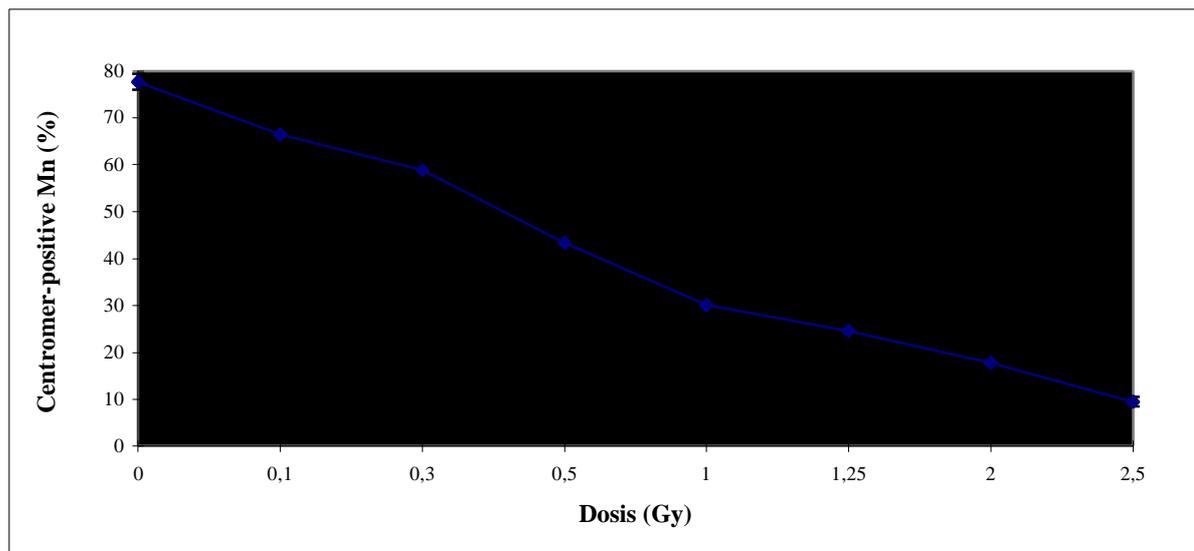
Ein Nachteil des Mikronukleustestes ist, wie bereits erwähnt, eine hohe inter und intraindividuelle Variabilität der spontanen Mikronukleusfrequenzen (Gantenberg et al., 1991). Diese Tatsache ist für die geringe Sensitivität des Tests im Bereich niedriger Dosen von clastogenen Agenzien verantwortlich (Norppa et al., 1993; Vral et al., 1997). Norppa et al. (1993) beobachtete, daß das Cytochalasin-B in Konzentrationen zwischen 1 und 5 µg/ml Mikronuklei mit ganzen Chromosomen induziert. Sie schlugen vor, die Empfindlichkeit des Mikronukleustestes durch eine selektive Auswertung von Mikronuklei mit azentrischen Fragmenten zu steigern. Dementsprechend analysierten Vral et al. (1997) die Frequenzen von Centromer- negativen Mikronuklei (CMn) in peripheren Lymphocyten nach in vitro Bestrahlung mit Gamma- Strahlen und fanden tatsächlich, daß diese Methode die Sensitivität des Mikronukleustestes im Bereich niedriger Strahlendosen steigert.

Im Rahmen der vorliegenden Studie haben wir ebenfalls die Sensitivität des Centromer Mikronukleustestes nach Strahlenexposition mit der des konventionellen Cytochalasin-B Mikronukleustestes verglichen. Die Ergebnisse zeigen, daß im niedrigen Dosisbereich (bis 0,5 Gy), der Centromer- Mikronukleustest sensitiver ist als die herkömmliche Auswertung von Mikronuklei in binukleären Zellen. Unsere Ergebnisse bestätigen daher diejenigen von Vral et al. (1997).

Diese Autoren haben die Frequenz der Centromer-negativen Mikronuklei in einer bestimmten Anzahl von zweikernigen Lymphocyten bestimmt. Diese Methode setzt voraus, daß die zweikernigen Lymphocyten in den hybridisierten Präparaten identifiziert werden können. Wir fanden dies schwierig, denn die Zellen müssen vor der Hybridisierung mit Pepsin verdaut werden, was zum Verlust des Cytoplasmas führt. Aus diesem Grund analysierten wir eine bestimmte Anzahl an Mikronuklei und bestimmten den Prozentsatz der Centromerpositiven Mikronuklei (MnC+). Dabei wurden nur die Mikronuklei ausgewertet, die in der Nähe von zwei nebeneinanderliegenden Kernen vorkommen. Bei dieser Vorgehensweise war die Identifizierung eines Zweikerners nicht so entscheidend wie bei der Methode von Vral et al. (1997).

Ein weiteres Problem im niedrigen Dosisbereich sind die geringen Mikronukleusfrequenzen. Dementsprechend benötigt man mehr binukleate Zellen, um eine repräsentative Zahl von Mikronuklei auszuwerten. Als Beispiel: in unseren Untersuchungen betrug der Mittelwert der Mikronukleusfrequenzen in unbestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender 18,8 Mikronuklei pro 1000 Bn-Zellen, man würde also ungefähr 5300 Bn-Zellen benötigen, um 100 Mikronuklei zu finden. Abhängig von der Dichte der Zellen auf dem Objektträger würde man 2-3 Präparate brauchen, um die oben genannte Auswertung durchzuführen. Dennoch fanden wir eine derartige Analyse von Mikronuklei überzeugender als die Auswertung der Centromer-negativen Mikronuklei in Bn-Zellen (Vral et al., 1997).

Ein offensichtlicher Nachteil dieser Methode ist, daß die erhaltene Dosiseffektkurve mit steigender Dosis abflachen wird, weil die relative Frequenz von Centromer-positiven Mikronuklei niedriger wird. Für die Überprüfung der Kinetik der Dosiseffektkurve nach höheren Dosen wurden die Lymphocyten von zwei gesunden Spendern (G1 und G2) bis 2,5 Gy in vitro bestrahlt. Wie man in der Abbildung 18 sieht, ist die relative Senkung des Verhältnisses: MnC+/MnC- nach 1 Gy kleiner als im Bereich zwischen 0-1 Gy. Im Zusammenhang mit der Tatsache, daß die Frequenz der Mikronuklei mit der Dosis nach dem linear-quadratischen Modell steigt (Wuttke et al., 1993), ist der konventionelle Mikronukleustest bei den Dosen über 1 Gy sensitiver.



**Abbildung 18: Centromer-positiv Mikronuklei in bestrahlten Lymphocyten von 2 gesunden Spendern (G1 und G2 bis 2,50 Gy)**

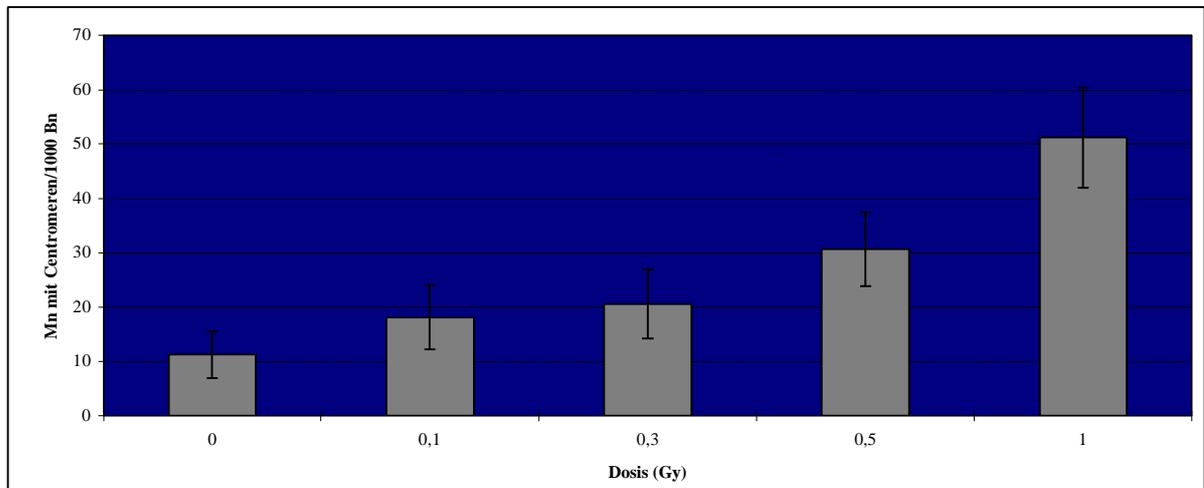
Obwohl die Empfindlichkeit des Centromer Mikronukleustestes im Bereich niedriger Dosen höher ist als die des konventionellen Mikronukleustestes, so reichte sie in den meisten Fällen nicht aus, um auf dem Niveau eines Individuums bei der kleinsten angewendeten Bestrahlungsdosis von 0,1 Gy eine signifikante Senkung der relativen MnC+ Häufigkeit zu erzielen.

Eine Lösung des Problems die Messung niedriger Dosen durch die biologischen Dosimeter zu erfassen, wäre vorteilhaft im Falle eines Strahlenunfalls, wenn eine Ermittlung der absorbierten Strahlendosis der einzelnen Personen notwendig ist und geeignete physikalische Verfahren fehlen. Um dies zu erzielen, haben wir die Ergebnisse von beiden Tests nämlich von dem konventionellen- und dem Centromer-Mikronukleustest kombiniert. Bei zwei voneinander unabhängigen Tests kann man die erhaltenen  $p$ Werte multiplizieren. In unseren Untersuchungen war diese Prozedur berechtigt, weil kein Grund zur Annahme besteht, daß die Frequenz der Mikronuklei die relative Frequenz der Centromer-positiven Mikronuklei beeinflußt und umgekehrt: es gibt keine Hinweise dafür, daß die relative Häufigkeit von Centromer-positiven Mikronuklei einen Einfluß auf die Anzahl der Mikronuklei hat. Es ergibt sich ein statistischer Sinn: beide Ergebnisse sind voneinander unabhängig, ein Mikronukleus existiert entweder als Centromer-positive oder Centromer-negative Einheit.

Die Kombination beider Tests ergab signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollwerten und den Werten von 0,10 Gy bei 7 von 9 gesunden Spendern (siehe Ergebnisse, Tabelle 12). Deshalb ist dieses Verfahren vielversprechend zur weiteren Erhöhung der Sensitivität dieses biologischen Dosimeters.

Centromer-positive Mikronuklei können bei der Schädigung des Spindelapparates oder als Konsequenz sog. Anaphase-Brücken (Cornforth und Goodwin, 1991) auftreten. Obwohl ionisierende Strahlung vor allem Mikronuklei mit azentrischen Fragmenten hervorruft (Heddle und Carrano, 1977; Weissenborn und Streffer, 1991; Miller et al., 1991), hat sie auch Aneuploidie induzierende Effekte allerdings in geringem Ausmaß (Uchida et al., 1975). Unser Verfahren, in dem die Frequenz von Centromer-positiven Mikronuklei pro 100 Mikronuklei ausgewertet wurde, erlaubt keine direkte Analyse der dosisabhängigen Veränderungen in der absoluten Frequenz von Centromer-positiven Mikronuklei. Diese Werte können aber ausgerechnet werden auf der Basis der Mikronukleushäufigkeiten beim konventionellen Mikronukleustest. Solche rekonstruierten Ergebnisse zeigen eine dosisabhängige Steigerung von Centromer-positiven Mikronuklei (Abbildung 19). Ähnliche Ergebnisse wurden von

Daurrodi et al. (1996), Cornforth und Goodwin (1991), Miller et al. (1992), Vral et al. (1997) beobachtet.



**Abbildung 19: Die absoluten Häufigkeiten von Mikronuklei mit Centromeren per 1000 binukleären Lymphocyten von gesunden Spendern**

Theoretisch könnte man erwarten, daß die Mikronuklei mit steigender Dosis mehr dizentrische Chromosomen beinhalten. Unsere Analyse der Verteilung der Centromer-Signale in Mikronuklei zeigte keine dosisabhängige Zunahme der Mikronuklei mit 2 Signalen (Abbildung 20). Ähnliche Effekte wurden bei Weissenborn und Streffer (1991) beobachtet, die Mikronuklei mit Kinetochoren in Tumor-Zellen analysierten. Dies deutet daraufhin, daß die steigende Frequenz von Centromer-positiven Mikronuklei hauptsächlich auf einzelne komplette Chromosomen zurückzuführen ist und die dizentrischen Chromosomen sehr selten von dem Hauptkern in Form von Mikronuklei ausgeschlossen sind. Derartige Schlußfolgerungen wurden von Miller et al. (1991) präsentiert.

Die Tatsache, daß eine deutliche Dosisabhängigkeit für die Anzahl von Centromer-Signalen pro Mikronukleus nicht beobachtet wurde, läßt den Verdacht aufkommen, daß eine genaue Quantifizierung von Centromer-Signalen in Mikrokernen mit der FISH-Technik nicht einfach ist. Bessere Ergebnisse könnte man vielleicht erreichen bei der Durchführung der *in situ*-Hybridisierung mit Centromer Sonden an Zellen in Suspension mit anschließender Laser Scanning-Mikroskop-Analyse.

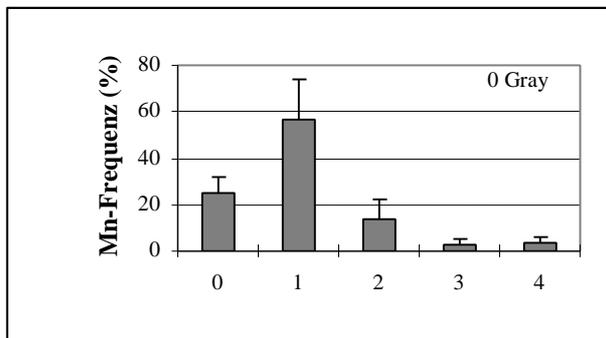
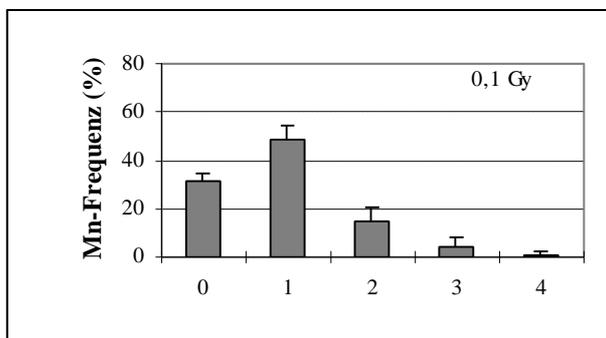
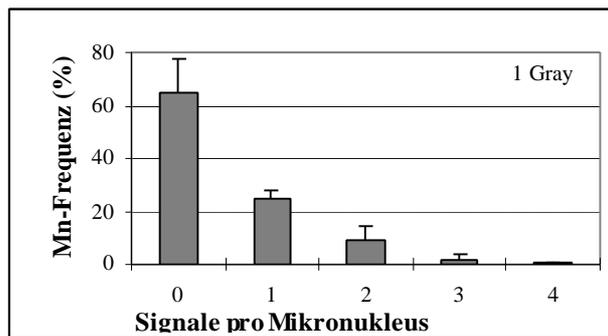
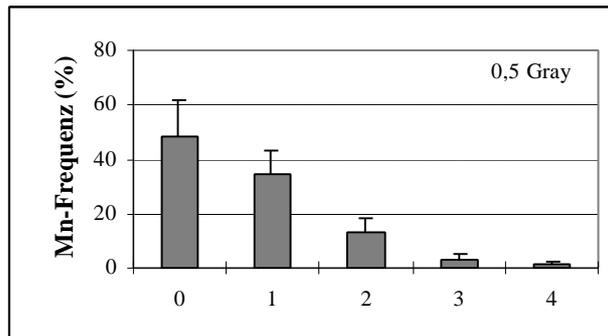
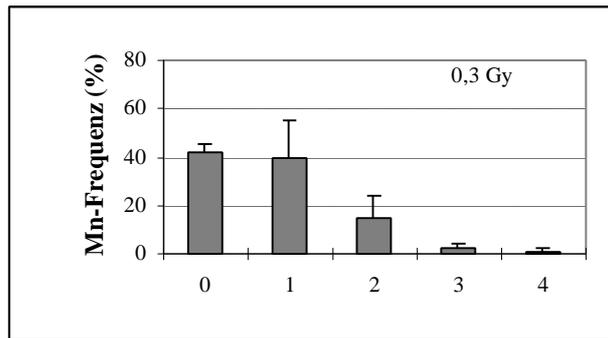


Abbildung 20:  
**Die Frequenz von Centromersignalen in  
Mikronuklei der bestrahlten  
Lymphocyten der gesunden Spender**





#### 4.4.2.1 Nachweis der Strahlenexpositionen mit dem Centromer-Mikronukleustest

Die Untersuchungen am Blut von ehemaligen Uranbergarbeitern zeigten, daß es offensichtlich möglich ist, mit dem Centromer-Mikronukleustest Strahlenexpositionen, die einige Jahre zurückliegen, nachzuweisen. Die Auswertung von Mikronuklei mit und ohne Centromere in Lymphocyten von früheren Wismut-Arbeitern, die während ihrer Tätigkeit bei der Wismut AG sehr hohen Strahlendosen ausgesetzt waren, ergab, daß der prozentuale Anteil von Centromer-positiven Mikronuklei bei Uranbergarbeitern signifikant niedriger ist als bei gesunden Spendern. Außerdem wurden signifikant weniger Mikronuklei mit Centromeren bei Wismut Spendern mit Tumor als bei Wismut-Spendern ohne Tumor ermittelt. Da diese Strahlenexpositionen vor vielen Jahren stattgefunden haben, ist es nicht mehr möglich, die einzelnen absorbierten Dosen aus der Kalibrationskurve des Centromer-Mikronukleustestes zu rekonstruieren.

#### 4.5 Chromosomenaberrationen und Genomische Instabilität

Die Analyse von Chromosomenaberrationen diente dazu, eine bessere Charakterisierung der Aberrationen zu erhalten, die zu Mikronuklei führen. Die Auswertung von Chromosomenaberrationen von 7 gesunden Spendern und 12 Wismut-Arbeitern mit Tumor zeigte, daß die Wismut-Beschäftigten signifikant mehr Aberrationen aufweisen als die normalen Spender. Die Ergebnisse können so interpretiert werden, daß durch die Strahlenexpositionen eine genomische Instabilität eingetreten ist, so daß neue Chromosomenbrüche auftreten, die dann zu der Expression von Mikronuklei führen. Derartige chromosomale Instabilitäten könnten zu schwerwiegenden gesundheitlichen Schäden führen und bei der Karzinogenese von erheblicher Bedeutung sein.

Der DNA- Doppelstrangbruch stellt eine Läsion dar, die letztendlich für die Entstehung einer Aberration verantwortlich gemacht wird. Ein Doppelstrangbruch muß aber nicht unbedingt die Primärläsion sein, die zu einer Aberration führt. Entsteht ein Doppelstrangbruch in der G<sub>1</sub>-Phase und führt zu einer Aberration, dann ist diese in der Mitose als Aberration mit der Läsion beider Chromatiden (Chromosomen-Typ Aberration) sichtbar. Die Ursache liegt darin, daß der Doppelstrangbruch während der S-Phase verdoppelt wird und somit beide Chromatiden betrifft (Savage, 1975). Nur sehr wenige Agenzien sind imstande, Chromosomen-Typ-Aberrationen auszulösen. Zu ihnen gehören ionisierende Strahlung, Restriktionsenzyme und Bleomycin, die direkt Doppelstrangbrüche induzieren können. Die Spontanrate der Chromosomen-Typ-Aberrationen ist generell sehr niedrig (spontane Frequenz an dizentrischen Chromosomen 0,28/1000 Zellen, Bender et al., 1988). Die in unseren Untersuchungen sehr hohe Anzahl an dizentrischen Chromosomen bei Wismut-Spendern mit Tumor (WT) ist meistens auf die Strahlentherapie zurückzuführen. Die am häufigsten von uns beobachteten Aberrationen gehören zu den Chromatid-Typ-Aberrationen, bei denen nur eine Chromatide gebrochen ist. Alle Agenzien, die Einzelstrang-DNA-Läsionen auslösen (Einzelstrangbrüche, Alkylierung, DNA-Addukte, DNA-Vernetzung, Basenveränderung) induzieren in der G<sub>1</sub>-Phase keine Chromosomen-Typ, sondern Chromatid-Typ Aberrationen. Der Grund dafür liegt darin, daß die Einzelstrang-DNA-Läsion erst während der S-Phase in DNA-Doppelstrangbrüche umgewandelt werden und zur Entstehung von Aberrationen führen können.

Für die Entwicklung eines Tumors nach Bestrahlung, ist die Abfolge mehrerer Schritte notwendig. Es kommt chromosomalen Veränderungen und der DNA-Reparatur bei diesen Prozessen eine besondere Bedeutung zu. Ferner kann sich im Laufe dieser Prozesse eine genomische Instabilität entwickeln (Streffler et al., 1997). Als unbestritten gilt, daß jede Strahlenexposition das Krebsrisiko erhöht. Aus den Untersuchungen an den Atombombenüberlebenden in Hiroshima und Nagasaki weiß man, daß strahleninduzierte Tumoren mit einer zeitlichen Verzögerung, der sog. Latenzzeit auftreten. Die minimale Latenzzeit beträgt für die meisten Tumoren bei den Erwachsenen ca. 10 Jahre, für Leukämie etwa 2 Jahre. Die spontane Rate der Tumorerkrankungen nimmt mit dem Alter zu. Die spontane Häufigkeit der Mutationen in den Zellen eines Organismus wurde von vielen Autoren untersucht. Sie scheint zu niedrig zu sein, um für die zahlreichen genetischen Veränderungen, die in Tumorzellen beobachtet wurden, verantwortlich zu sein (Loeb, 1991). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß die Mutationen in einem bestimmten Stadium der Tumorgenese mit erhöhter Rate auftreten. Dieser Effekt wurde mit der genomischen Instabilität in Verbindung gebracht (Morgan et al., 1996).

Der Verlust der genomischen Stabilität in Tumorzellen ist weithin akzeptiert als einer der wichtigsten Aspekte der Karzinogenese (Cheng und Loeb, 1993; Tlsty et al., 1993). Die genomische Instabilität von Tumorzellen betrifft molekulare, morphologische und biochemische Charakteristika, aber am häufigsten wurden zytogenetische Veränderungen beschrieben (Solomon et al., 1991; Rabbitts 1994).

Seit vielen Jahren verbindet man ionisierende Strahlung mit dem erhöhten Auftreten von Tumoren (Morgan et al., 1996; Sabatier et al., 1995; Sankaranarayanan und Chakraborty, 1995) und potentielle Mechanismen wurden von Cox (1994) beschrieben. Im wesentlichen konzentriert sich die Rolle der genomischen Instabilität auf die Entwicklung strahleninduzierter Karzinogenese (Kronenberg, 1994).

Die molekularen, genetischen und zellulären Ereignisse, die zu der genomischen Destabilisierung führen sind unklar. Für die genaue Übertragung der genetischen Information von einer Zelle auf die Nachkommen sind viele Gene notwendig. Eine Mutation in einem von diesen Genen könnte ein erster Schritt in der Tumorgenese sein und anschließend viele Mutationen auslösen, die in den Tumorzellen beobachtet werden (Morgan et al., 1996).

Der von Puck und Marcus im Jahre 1956 eingeführte Kolonibildungstest zeigte, daß die Zellen nach in vitro Bestrahlung einem mitotischen Tod unterliegen. Es treten in den ersten

Mitosen nach der Bestrahlung Chromosomenaberrationen auf, die teilweise zum Verlust des genetischen Materials führen. Zwar können solche Zellen, die ein Teil des genetischen Materials verloren haben, proliferieren, sie sterben aber nach einigen Zellteilungen ab. Bald wurde beobachtet, daß nicht alle Zellen, die eine Bestrahlung überlebt haben (die also „gesund“ sein sollten), gleich große Kolonien bilden, wie unbestrahlte Zellen. Für diesen Effekt, sog. „small colony formation“, fand man sehr lange keine Erklärung. Beer et al., (1979) beschrieben diesen Effekt als vererbare Schädigung des genetischen Materials und damit verbunden ist die dauerhafte Verminderung der Fähigkeit zur Proliferation.

Schon im Jahre 1989 beschrieben Pampfer und Streffer einen signifikanten Anstieg der Chromatid- und Chromosomenaberrationen in Fibroblasten von MausFöten vom Tag 19 der Schwangerschaft, die im Zygoten-Stadium mit Röntgenstrahlen bestrahlt worden waren. Übertragbare chromosomale Instabilität wurde durch Weissenborn und Streffer (1989) gezeigt, die 1-zellige Mausembryonen mit Röntgenstrahlen und Neutronen bestrahlten. Diese Studie wies nach, daß nicht nur in der 1. Mitose nach der Bestrahlung Chromosomenaberrationen auftreten, sondern auch während der 2. und 3. Mitose.

Kadhim et al. (1992) beobachteten, daß  $\alpha$ -Teilchen wirksame Auslöser von Chromatid- und Chromosomenaberrationen in klonogenen und nichtklonogenen Zellkulturen bei Maus und humanen Stammzellen sind. Martins et al. (1993) demonstrierten chromosomale Instabilität in humanen Fibroblasten nach Expositionen mit schweren Ionen (Argon, Neon, Blei). Die Autoren beobachteten die Zellen mehrere Passagen nach der Exposition, wobei mit zunehmender Anzahl der Zellteilungen die Häufigkeit von Chromosomenaberrationen anstieg.

Die von uns beobachteten Chromosomenaberrationen bei WismutSpendern mit Tumor können Folge einer früheren Strahlenexposition sein. Die Ergebnisse können so interpretiert werden, daß durch Jahrzehnte zurückliegende Strahlenexpositionen eine genomische Instabilität eingetreten ist, wodurch später neue Chromosomenbrüche entstanden, die zu Mikronuklei führten. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung der Mikronuklei und die zusätzlichen Centromer Analysen in Mikronuklei zeigen, daß cytogenetische Schäden als Folge einer Strahlenexposition noch heute erfaßbar sind.

Im Bezug auf den Nachweis von früheren Strahlenexpositionen hat sich der Centromer-Mikronukleustest als gutes cytogenetisches Verfahren bewährt. Die Anzahl von Centromer-positiven Mikronuklei bei den WismutArbeitern war signifikant niedriger als bei gesunden

Spendern. Dazu wurden auch signifikante Unterschiede bei der Anzahl von Centromerhaltigen Mikronuklei zwischen beiden Wismut-Arbeiter Gruppen beobachtet: Wismut-Spender mit Tumor (WT) wiesen deutlich weniger Mikronuklei mit Centromeren als Wismut-Spender ohne Tumor (W) auf.

Sehr beeindruckend ist, daß die Veränderungen des genetischen Materials, die auf eine genomische Instabilität zurückgeführt werden können, nicht in Tumorzellen sondern in Blutzellen (Lymphocyten) gefunden wurden. Damit hat sich die Eignung der Lymphocyten des peripheren Blutes für die biologische Dosimetrie bestätigt. Stammzellen und langlebige peripheren Lymphocyten (Gedächtniszellen) haben den cytogenetischen Schaden für Jahrzehnte konserviert. Solche Beobachtungen wurden auch bei strahlenbehandelten Patienten (Buckton et al., 1983) und den Überlebenden nach den Atombombenabwürfen (Sasaki und Miyata, 1968) gemacht.

## 5. Zusammenfassung

Ein Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung der Einsetzbarkeit des Mikronukleustestes in der biologischen Dosimetrie. Als Schwerpunkt wurde die Möglichkeit der Verwendung des Testes im niedrigen Dosisbereich (unter 0,5 Gy) festgelegt. Es wurde versucht, die Empfindlichkeit des Mikronukleustestes zu steigern, indem die strahleninduzierten von den „spontan“ entstandenen Mikronuklei unterschieden wurden. Zu diesem Zweck wurden DNA-Sonden gegen Centromere eingesetzt. Es wurde auch der Frage nachgegangen, ob man frühere Strahlenexpositionen mit dem Mikronukleustest erfassen kann. Dazu wurden Vergleiche zwischen den in vitro induzierten Mikronukleushäufigkeiten in Lymphocyten der gesunden Spender mit den unbestrahlten Lymphocyten der ehemaligen Uranbergarbeiter der Wismut AG erstellt. In allen untersuchten Gruppen wurde auch zwischen strahleninduzierten und „spontanen“ Mikronuklei mit Hilfe von DNA-Centromer Sonden differenziert.

Auswertungen der Chromosomenaberrationen sollten einer besseren Charakterisierung der Aberrationen dienen, die zu Mikronuklei führen können. Von der Etablierung des „Centromer - Mikronukleustestes“ erhofft man sich eine Alternative bzw. Ergänzung zu der traditionellen Metaphase-Chromosomen-Untersuchung.

### 5.1 Randbedingung des Mikronukleustestes

Untersuchungen zu den Randbedingungen des Mikronukleustestes mit menschlichen Blutlymphocyten sind von Wuttke (1993, Dissertation) durchgeführt worden. Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß eine reproduzierbare Proliferation und Mikronukleus-Expression erzielt wurde, wenn die Zelldichte  $1-2 \times 10^5$ /ml Medium betrug. Daher wurde im Rahmen unseren Untersuchungen darauf geachtet, daß die Lymphocyten-dichte bei allen angesetzten Kulturen innerhalb dieses Bereiches lag.

Um die von Schrek und Stefani (1964), Stewart et al. (1988) beschriebene und von Wuttke (1993, Dissertation) überprüfte Veränderung der Zellproliferation nach Zugabe von PHA vor und nach der Bestrahlung zu verhindern, wurden in unseren Untersuchungen die Lymphocyten zuerst in vitro mit Röntgenstrahlen bestrahlt und dann mit PHA stimuliert.

Die Cytochalasin B Zugabe 44 h nach Kulturbeginn (Fenech und Morley, 1985 a, b) stellte sich als optimaler Zeitpunkt für alle gesunden und die meisten Wismut -Spender dar.

## **5.2 Dosiswirkungsbeziehung der Mikronukleusfrequenz in binuklären Lymphocyten**

Es wurde eine linear-quadratische Dosiswirkungbeziehung für in vitro bestrahlte Lymphocyten der gesunden Spender ermittelt (Mn/Bn = Mikronukleusfrequenz; D = Dosis [Gy]).

$$\text{Mn/Bn} = 0,017 + 0,049D + 0,075D^2$$

Die Verteilung der Mikronuklei in Lymphocyten wurde auf eine Abweichung von der Poissonverteilung untersucht (U-Test nach Edwards et al. 1979). In den meisten Fällen lag eine Überverteilung vor.

In allen untersuchten Gruppen wurden intraindividuelle Variabilitäten in den spontanen sowie induzierten Mikronukleusfrequenzen beobachtet.

Bei den Mikronukleus-Spontanraten in Lymphocyten der gesunden Probanden (Mittelwert 0,015 Mn/Bn), Wismut-Arbeiter ohne Tumor (Mittelwert 0,021 Mn/Bn) und Wismut -Spender mit Tumor ohne Strahlentherapie (Mittelwert 0,20 Mn/Bn) wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Dagegen waren die spontanen Mikronukleushäufigkeiten der Wismut-Spender mit Tumor, die einer Strahlentherapie erhalten hatten (Mittelwert 0,073 Mn/Bn) signifikant höher als die Mikronukleusraten in jeder oben erwähnten Gruppe.

Die Mikronukleusfrequenzen der Lymphocyten von gesunden Spendern nach in vitro Bestrahlung mit niedrigen Dosen (bis 0,50 Gy) zeigten signifikante Unterschiede gegenüber den unbestrahlten Lymphocyten nur auf dem Populationsniveau. Erst ab 0,50 Gy Röntgenstrahlen wurden bei allen Spendern signifikante Unterschiede der Mikronukleushäufigkeiten gegenüber den spontanen Mikronukleusraten beobachtet.

## **5.3 Analyse von Centromersignalen in Mikronuklei**

Die Untersuchungen von Centromer-positiven Mikronuklei in unbestrahlten Lymphocyten haben ergeben, daß spontan entstehende Mikronuklei vorwiegend auf ganze Chromosomen zurückzuführen sind, da in jeder Gruppe in den meisten spontanen Mikronuklei Centromer-Signale beobachtet wurden. Allerdings wurden bei den Centromer-Analysen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen o.g. Gruppen (G,W,WT) ermittelt. Die Untersuchung des Anteils an Mikronuklei mit Centromeren ergab, daß in Lymphocyten von nicht-exponierten Personen (gesunde Spender) in 74,5% (Mittelwert) der Mikronuklei Centromere auftraten. Bei den Wismut-Arbeitern, die Expositionen untertage erhielten, wurden dagegen nur 62,1% (Wismut-Arbeiter ohne Tumor) und 55,6% (Wismut-Arbeiter mit Tumor) Centromer-positive Mikronuklei beobachtet.

Dies bedeutet, daß offensichtlich der Anteil an Mikronuklei, die aus azentrischen Fragmenten (Centromer-negativ) gebildet worden sind, bei den exponierten Personen signifikant erhöht gegenüber nicht exponierten Personen ist. Wismut-Arbeiter mit Tumor wiesen signifikant weniger Centromer-haltige Mikronuklei, nicht nur gegenüber den gesunden Spendern, sondern auch gegenüber den Wismut-Arbeitern ohne Tumor auf, was durch eine zunehmende genomische Instabilität bedingt sein könnte.

Die Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung der Mikronuklei und die zusätzlichen Centromer-Analysen in Mikronuklei zeigen, daß cytogenetische Schäden als Folge einer Strahlenexposition noch heute erfaßbar sind.

### **5.3.1 Centromer-positive Mikronuklei in bestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender**

Nach Bestrahlung nahm die Anzahl der Centromer-positiven Mikronuklei dosisabhängig ab. Schon nach 0,10 Gy wurden signifikante Unterschiede an Centromer-haltigen Mikronuklei im Vergleich zu den Kontrollwerten festgestellt (Mittelwert 68,3%). Die höheren Bestrahlungsdosen bewirkten eine relative Abnahme der Centromer-positiven Mikronuklei. Mit Hilfe des Centromer-Mikronukleustest können frühere Strahlenexpositionen nachgewiesen werden. Allerdings ist die Ermittlung der Strahlendosen bei den Wismut-Arbeitern nicht mehr möglich, da die Strahlenexpositionen einige Jahre zurück liegen.

#### **5.4 Statistische Kombination der Ergebnisse des Mikronukleustestes und der Centromer-Analyse bei gesunden Spendern**

Hinsichtlich der Steigerung der Empfindlichkeit des biologischen Dosimeters im Bereich niedriger Strahlendosen, wurde der Versuch unternommen, die aus dem Mikronukleustest und aus dem Mikronukleus-Centromertest ermittelten p-Werte miteinander zu kombinieren. Im Mikronukleustest oder Mikronukleus-Centromertest allein wurde bei keinem Spender ein signifikanter Unterschied zwischen 0 und 0,1 Gy beobachtet. Eine Kombination beider Tests ergab einen signifikanten Unterschied bei 6 aus 9 gesunden Spendern, wodurch die Empfindlichkeit des Mikronukleustestes auf dem individuellen Niveau gesteigert wurde. Es wird bereits möglich, 0,1 Gy bei einzelnen Personen nachzuweisen.

#### **5.5 Analyse von Chromosomenaberrationen**

Die Analyse von Chromosomenaberrationen in unbestrahlten Lymphocyten der gesunden Spender und Wismut-Arbeiter mit Tumor wurde als eine erweiterte Untersuchung cytogenetischer Schäden angewendet.

Die Aberrationshäufigkeit in Lymphocyten der Wismut-Arbeiter mit Tumor war signifikant höher als in den Lymphocyten gesunder Spender.

Es wurden keine Korrelationen zwischen Mikronukleushäufigkeiten und Chromosomenaberrationen bei gesunden Spendern und Wismut-Arbeitern mit Tumor ermittelt. Es wurde dagegen eine gute negative Korrelation zwischen Centromer-positiven Mikronuklei und Chromosomenaberrationen bei Wismut-Arbeitern mit Tumor ( $r = -0,7497$ ) beobachtet.

## 6. Literatur

- Au, W.W., D.W. Walker, J.B. Jr. Ward, E. Whorton, M.S. Legator, V. Singh (1991): Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. *Mutat. Res.*, 260, 137-144.
- Bansal, N., A.G. Houle, G. Mylenkovych (1989): Comparison of dexamethasone and lovastatin (mevinolin) as growth inhibitors in cultures of Tcell derived human acute leukemia lines (CEM). *Leukemia Research*, 13 (10), 875-882.
- Becker, P., H. Scherthan, H. Zankl (1990): Use of centromere-specific DNA probe (p82H) in nonisotopic in situ hybridization for classification of micronuclei. *Genes Chrom. Cancer*, 2, 59-62.
- Beer, J.Z. (1979): Heritable lesions affecting proliferation of irradiated mammalian cells. *Adv. Radiat. Biol.*, 8, 363-417.
- Bender, M.A., A.A. Awa, A.L. Brooks, H.J. Evans, P.G. Groer, L.G. Littelfield, C. Pereira, R.J. Preston, B.W. Wachholz (1988): Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mutat. Res.*, 196, 103-159.
- Böcker, W., W.-U.Müller, C. Streffer, C. Yu (1996): Automated scoring of micronuclei in binucleated human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 70, 529-537.
- Brenner, S.L., L.-H. Liaw, M.W. Berns (1980): Laser microirradiation of kinetochores in mitotic PtK2 cells: chromatid separation and micronucleus formation. *Cell Biophys.*, 2, 139-152.
- Brüske-Hohfeldt, I., M. Möhner, H.-E. Wichmann: (1997): Predicted number of lung cancer cases in Germany among former uranium miners of the Wismut. *Health Phys. Society*, 72, 39.

Buckton, K.E. (1983): Chromosome aberrations in patients treated with X-irradiation for ankylosing spondylitis. Radiation-induced chromosome damage in man, Alan R. Liss, New York, 491-511.

Chai, L.S., J.M. Schumer, A.A. Sandberg (1985): Effect of mitochondrial inhibitors on metaphase-telophase progression and nuclear membrane formation in Chinese hamster cells. *Cell Tissue Kinet.*, 18, 13-25

Cheng, K.C., L.A. Leob (1993): Genomic instability and tumor progression: mechanistic considerations. *Adv. Cancer Res.*, 60, 121-156.

Cornforth, M.N., E.H. Goodwin (1991): Transmission of radiation-induced acentric chromosomal fragments to micronuclei in normal human fibroblasts. *Radiat. Res.*, 126, 210-217.

Cox, R. (1994): Molecular mechanisms of radiation oncogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.*, 65, 57-64.

Darroudi, F., M. Meijers, V. Hadejidekova, A.T. Natarajan (1996): Detection of aneugenic and clastogenic potential of X-rays, directly and indirectly acting chemicals in human hepatoma (Hep G2) and peripheral blood lymphocytes, using the micronucleus assay and fluorescent in situ hybridization with a DNA centromeric probe. *Mutagenesis*, 11, 425-433.

Degrassi, F., C. Tanzarella (1988): Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy. *Mutation Res.*, 203, 339-345.

Degrassi; F., C Tanzarella (1988): Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy. *Mutat. Res.*, 203, 339-345.

Earnshaw, W.C.; N. Rothfield (1985): Identification of family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma*, 91, 313-321.

- Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989): Identification of aneuploidy-inducing agents using the cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environm. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.
- Edwards, A.A., D.C. Lloyd, R.J. Purrot (1979): Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution. *Radiat. Environ. Biophys.*, 16, 89-100.
- Enderle, G.J., K. Friedrich (1995): East German Uranium Miners (Wismut) Exposure Conditions and Health Consequences. *Stem Cells* 13(1), 78-89.
- Evans, H.J. (1988): Mutation cytogenetics: past, present and future. *Mutat. Res.*, 204, 355-363.
- Evans, H.J., Buckton, G.E. Hamilton, A. Carothers (1979): Radiation induced chromosome aberrations in nuclear-dockyard workers. *Nature*, 277, 531-534.
- Fenech M., A.A. Morley (1985a): Solutions of the kinetics problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, 43, 233-246.
- Fenech M., A.A. Morley (1985b): Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, 147, 29-36.
- Fenech, M., A.A. Morley (1985c): The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutat. Res.*, 148, 99-105.
- Fenech, M., A.A. Morley (1986): Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-radiation. *Mutat. Res.*, 161, 193-198.
- Fenech, M., A.A. Morley (1989): Kinetochore detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss. *Mutagenesis*, 4, 98-104.

Fenech, M., J. Denham, W. Francis, A. Morley (1990): Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.*, 57, 373-383.

Flidner, T.M., G. Andrews, E.P. Cronkite, V.P. Bond (1964): Early and late cytological effects of whole body irradiation on human bone marrow. *Blood*, 223, 471-487.

Gantenberg, H.-W., K. Wuttke, C. Streffer, W.-U. Müller (1991): Micronuclei in human lymphocytes irradiated in vitro or in vivo. *Radiat. Res.*, 128, 276-281.

Guscova, A.K., A. V. Barabanova, A. Y, et al. (1988): Acute radiation effects in victims of the Chernobyl nuclear plant accident. *UNESCEAR Report, 1988, Sources and Effects of Ionizing Radiation, Appendix (United Nations, New York)*, 613-631.

Hall, S.C., J. Wells (1988): Micronuclei in human lymphocytes as a biological dose-meter: preliminary data following beta irradiation in vitro. *J. Radiol. Protec.*, 8, 97-102.

Heddle, J.A., A.V. Carrano (1977): The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutat. Res.*, 44, 63-69.

Högstedt, B., A. Karlsson (1985): The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutation Res.*, 156, 229-232.

Högstedt, B., A. Karlsson, A. Holmen (1988a): Frequencies of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes stimulated in vitro by phytohemagglutinin and pokeweed mitogen. *Hereditas*, 109, 53-55.

Högstedt, B., I. Bratt, A. Holmen, L. Hagmar, S. Skerfving (1988b): Frequency and size distribution of micronuclei in lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin and pokeweed mitogen in workers exposed to piperazine. *Hereditas*, 109, 139-142.

Huber, R., H. Braselmann, M. Bauchinger (1989): Screening for interindividual differences in radiosensitivity by means of the micronucleus assay in human lymphocytes. *Radiat. Environ. Biophys.*, 28, 113-120.

Huber, R., H. Braselmann, M. Bauchinger (1992): Inter- and intraindividual variations of background and radiation-induced micronucleus frequencies in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 61, 655-661

Huber, R., K. Salassidis, H. Braselmann, M. Bauchinger (1996): Detection of centromeres in vinblastine- and radiation-induced micronuclei of human lymphocytes using FISH with an alpha satellite pancentromeric DNA probe. *Environ. Mol. Mutagen.*, 27, 105-109.

IAEA (1988): Technical Report Series No. 260, Biological Dosimetry: Chromosomal Aberrations Analysis for Dose Assessment (International Atomic Energy Agency, Vienna), pp.1-69

Jagetia, G.C. (1990): Frequency of micronucleated cells in the mouse bone marrow after exposure to various doses of gamma-radiation. *Mutat. Res.*, 230, 45-48.

Kadhim, M.A., D.A. Macdonald, D.T. Goodhead, S.A. Lorimore, S.J. Marsden, E.G. Wright (1992): Transmission of chromosomal instability after plutonium alpha-particle irradiation. *Nature*, 355, 738-740.

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 Genet Cytogenet.*, 22, 137-141.

Kormos, C., G.J. Köteles (1988): Micronuclei in X-irradiated human lymphocytes. *Mut. Res.*, 199, 31-35.

Kronenberg, A. (1994): Radiation-induced genomic instability. *Int. J. Radiat. Biol.*, 66, 603-609.

- Kus, J., K.S. Tse, S. Vedal, M. Chan-Yeung (1985): Lymphocyte subpopulations in patients with allergic and non-allergic asthma. *Clin. Allergy*, 15 (6), 523-529.
- Larramendy, M.L., S. Knuutila (1991): Increased frequency of micronuclei in B and T lymphocytes from smokers. *Mut. Res.*, 259, 189-195.
- Lea, D.E., D.G. Catcheside (1942): The mechanism of the induction by irradiation of chromosome aberrations in *Tradescantia*. *J. Genet.* 44, 216-245.
- Loeb, L.A (1991): Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.*, 51, 3075-3079.
- Littlefield, L.G., A.M. Sayer, E.L. Frome (1989): Comparison of dose-response parameters for radiation-induced acentric fragments and micronuclei observed in cytokinesis-arrested lymphocytes. *Mutagenesis*, 4, 265-270.
- Lloyd, D.C., A.A. Edwards, J.S. Prosser (1986): Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by in vitro acute X and gamma irradiation. *Rad. Prot. Dosim.*, 15, 8388.
- Lloyd, D.C., R.J. Purrott, E.J. Reeder (1980): The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people. *Mutat. Res.*, 72, 523-532.
- Lubin, J.H.; Jr.J.D. Boice, Ch. Edling (1995), u. a.: Lung cancer in radon-exposed miners and estimation of risk from indoor exposure. *Journal of the Natl. Cancer Inst.*, 87, 817-827.
- Maier, P., W. Schmidt (1976): The model mutagens evaluated by the micronucleus test. *Mutat. Res.*, 40, 325-338.
- Martins, M.B., L. Sabatier, M. Ricoul, A. Pinton, B. Dutrillaux (1993): Specific chromosome instability induced by heavy ions: a step towards transformation of human fibroblasts? *Mutat. Res.*, 285, 229-237.

- Migliore, L., P. Guoidotti, C. Favre, M. Nardi, M.R. Sessa, E. Brunori (1991): Micronuclei in lymphocytes of young patients under antileukemic therapy. *Mutat. Res.*, 263, 243-248.
- Miller, B.M., M. Nüsse (1993): Analysis of micronuclei induced by 2-chlorobenzylidene malonitrile (CS) using fluorescence in situ hybridization with telomeric and centromeric DNA probes and flow cytometry. *Mutagenesis*, 8, 35-41.
- Miller, B.M., T. Werner, H.-U. Weier, M. Nüsse (1992): Analysis of radiation induced micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) simultaneous using telomeric and centromeric DNA probes. *Radiation Res.*, 131, 177-185.
- Morgan, W.F., J.P. Day, M.I. Kaplan, E.M. McGhee, C.L. Limoli (1996): Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat. Res.*, 146, 247-258.
- Müller W.-U., C. Streffer (1993): Der Mikronukleus-Test in der biologischen Dosimetrie. In: *Strahlenschutz in Forschung und Praxis*, 34, 107-117.
- Müller, W.-U., C. Streffer (1991): Biological indicators for radiation damage. *Int. J. Radiat. Biol.*, 59 (4), 863-873
- Müller, W.-U., I. Schlusen, C. Streffer (1991): Direct evidence that radiation induced micronuclei of early mouse embryos require a mitosis for expression. *Radiat. Environ. Biophys.* 30, 117-122.
- Müller, W.-U., C. Streffer (1993): Micronucleus assays. In: *Advances in Mutagenesis Research*, 4; G. Obe (Hrsg.), Springer, Berlin.
- Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage (199): A Nordic data base on somatic chromosome damage in humans. *Mutat. Res.*, 241, 325-337.
- Norman, A., S Cochran, D. Bass, D. Roe (1984): Effect of age, sex and diagnostic X-rays on chromosome damage. *Int. J. Radiat. Biol.*, 46 (3), 317-321.

Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993): Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization. *Mutagenesis*, 8, 519-525.

Obe, G., B. Beek (1975): The human leukocyte test system VII. Further investigations concerning micronucleus-derived premature chromosome condensation. *Humangenetik*, 30, 143-154.

Obe, G., B. Beek, V.G. Vaidya (1975a): The human leukocyte system III. Premature chromosome condensation from chemically and X-ray induced micronuclei. *Mutat. Res.*, 27, 89-101.

Ohta, Y., K. Fujiwara, T. Nishi, H. Oka (1986): Normal values of peripheral lymphocyte populations and T cell subsets at a fixed time of day: a flow cytometric analysis with monoclonal antibodies in 2210 healthy adults. *Clin. Exp. Immunol.*, 64, 146-149.

Ono, K., Y. Nagata, K. Akuta, M. Abe, K. Ando, S. Koike (1990): Frequency of micronuclei in hepatocytes following X and fast-neutron irradiations- An analysis by linear-quadratic model. *Radiat. Res.*, 123, 345-347.

Osanto, S., J.C. Thijssen, V.M. Woldering, J.L. van Rijn, A.T. Natarajan (1991): Increased frequency of chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes up to nine years following curative chemotherapy of patients with testicular carcinoma. *Environ. Mol. Mutagen.*, 17, 71-78.

Pampfer, S., C. Streffer (1989): Increased chromosome aberration levels in cells from mouse fetuses after zygote X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 55, 85-92.

Pincus, H., A. Callisen, A. Norman (1985): DNA-content of micronuclei in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 47, 423-432.

Potten, C.S. (1986): Possible dosimeters in skin and hair. *BGA-Schriften*, 2, 182-191.

- Prosser, J.S. (1976): Survival of human T and B lymphocytes after X-Irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 30, 459-565.
- Prosser, J.S., J.E. Moquet, D.C. Lloyd. E.E. Edwards (1988): Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mut. Res.*, 199, 3745.
- Puck, T.T., P.I. Marcus (1956): Action of X-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.*, 103, 273-284.
- Pylkkanen, L., I. Salonen (1987): Concomitant mutagenicity of ethanol and X-ray irradiation in the mouse male germ cells. *Alcohol*, 4, 401-404.
- Rabbitts, T.H. (1997): Chromosomal translocations in human cancer *Nature*, 372, 143-149.
- Ramalho, A.T., A.C.H. Nascimento, A.T. Natarajan (1988): Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiania (Brasil) radiation accident *Radiat. Protect. Dosim.*, 25, 97-100.
- Reddy, M.M., K.O. Goh, L.H. Hempelman (1980): Induction of micronuclei in PHA-stimulated human lymphocyte cultures by therapeutic radiation. *Experientia*, 36, 343-344.
- Rithidech, K., W.W. Au, V.M. Ramanujam, E.B. Jr. Whorton, M.S. Legator (1988): Persistence of micronuclei in peripheral blood normochromatic erythrocytes of subchronically benzene-treated male mice. *Environ. Mol. Mutagen.*, 12, 319-329.
- Roberts, C.J., G.R. Morgan, P.D. Holt (1986): A critical comparison of the micronucleus yield from high and low LET irradiation of plateau-phase cell populations. *Mutat. Res.*, 160, 237-242.
- Russell, L.B. (1962): Chromosome aberrations in experimental mammals. In: Steinberg AG, Bearn AG (eds) *Progress in medical genetics* (Grune and Stratton, New York), 2, 230-294.
- Sabatier, L., J. Lebeau, B. Dutrillaux (1995): Radiation-induced carcinogenesis : individual sensitivity and genomic instability *Radiat. Environ. Biophys.*, 34, 229-232

Salassidis, K., R. Huber, H. Zitzelsberger, M. Bauchinger (1992): Centromere detection in vinblastine and radiation-induced micronuclei of cytokinesisblocked mouse cells by using in situ hybridization with a mouse gamma (major) satellite DNA probe. *Environm. Mol. Mutagenesis*, 19, 1-6.

Salomon, E., J. Borrow, A.D. Goddard (1991): Chromosome aberrations and cancer. *Science*, 254, 1153-1160.

Sankaranarayanan, K., R. Chakraborty (1995): Cancer predisposition, radiosensitivity and risk of radiation-induced cancer. I. Background. *Radiat. Res.*, 143, 121-143.

Sasaki, M.S., H. Miyata (1968): Biological dosimetry in atomic bomb survivors. *Nature*, 220, 1189-1193.

Savage, J.R.G. (1975): Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genetics*, 12, 103-122.

Scarfi, M.R., A. Cossarizza, D. Monti, F. Bersani, M. Zannotti, M.B. Lioi, C. Franceschi (1990): Age-related increase of mitomycin C-induced micronuclei in lymphocytes from Down syndrome subjects. *Mut. Res.*, 237, 247-252.

Schrek, R., S. Stefani (1964): Radioresistence of phytohemagglutinin-treated normal and leukemic lymphocytes. *J. Natl. Cancer ins.*, 32 (2), 507-517.

Schuler, M., D.S. Rupa, D.A. Eastmond (1997): A critical evaluation of centromeric labeling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage in vitro. *Mutat. Res.*, 392, 81-95.

Schwartz, J.L., J.C. Darr, M.E. Gauden (1983): Survival and PHA-stimulation of gamma irradiated human peripheral blood T lymphocyte subpopulations. *Mutat. Res.*, 107, 413-425.

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 irradiation. *Environ. Mutagen.*, 2, 473-485.

Sieber, G., P. Zierach, F. Herrmann, V.J. Brust, H. Rühl (1985): Impaired B lymphocytes reactivity in patients after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 11, 777-782.

Signore, A. et al. (1985): Study of the diurnal variation of human lymphocyte subsets. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 17 (1), 25-28.

Slavutsky, I., S. Knuutila (1989): Micronucleus formations in different lymphocyte subpopulations in peplomycin-treated and control cultures. *Mut. Res.*, 219, 257-261.

Strahlenexpositionen und Strahleninduzierte Berufskrankheiten im Uranbergbau am Beispiel Wismut. Eds. Fachverband für Strahlenschutz eV, Publikationsreihe Fortschritte im Strahlenschutz, November, 1993.

Stewart, C.C., A.P. Stevenson, H.P. Habbersett (1988): The effect of low-dose irradiation on unstimulated and PHA-stimulated human lymphocyte subsets. *Int. J. Radiat. Biol.*, 53, 77-87.

Straume, T., J.N. Lucas, J.D. Tucker, W.L. Bigbee, R.G. Langlois (1992): Biodosimetry for radiation worker using multiple assays. *Health Phys.*, 62, 122-133.

Streffer, C., W.-U. Müller (1994): Biologische Dosimetrie zur Abschätzung des Strahlenschadens. In: Medizinische Maßnahmen bei Strahlenunfällen. Veröffentlichungen der Strahlenschutzkommission Band 27, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 113-132.

Streffer, C., W.-U. Müller, A. Kryscio, W. Böcker (1998): Micronuclei-biological indicator for retrospective dosimetry after exposure to ionizing radiation. *Mutat. Res.*, 404, 101-105.

Streffer, C., W.-U. Müller, A. Kryscio, T. Bauch, S. Schwenke, P. Bauer (1997): Bioindikatoren nach Bestrahlung bei Uranbergarbeitern. In: *Psychomentale Belastungen und Beanspruchungen im Wandel von Arbeitswelt und Umwelt; Kanzerogenese und Synkanzerogenese* (Rindt-Druck Fulda), 119-122.

Streffer, C., D. van Beuningen, E. Groß, J. Schabronath, F.-W. Eigler, A. Rebmann (1986): Predictive assays for the therapy of rectum carcinoma. *Radiotherapy and Oncology*, 5, 303-310.

Tan, E.M. (1989): Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.*, 44, 93-151.

Tanaka, K., T. Izumi, T. Ohkita, N. Kamada (1984): Micronuclei and chromosome aberrations found in bone marrow cells and lymphocytes from thorotrast patients and atomic bomb survivors. *Hiroshima J. Med. Sci.*, 33, 101-111.

Thierens, H., A. Vral, L. de Ridder (1991): Biological dosimetry using the micronucleus assay for lymphocytes: interindividual differences in dose response. *Health Phys.*, 61, 623-630.

Tlsty, T.D., P. Jonczyk, A. White, M. Sage, I. Hall, D. Schaefer, A. Briot, E. Livanos, H. Roelofs, B. Poulouse, J. Sanchez (1993): Loss of chromosomal integrity in neoplasia. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 58, 645-654.

Uchida, I.A., L. Viola, E.M. Byrnes (1975): Chromosome aberrations induced in vitro by low doses of radiation: nondisjunction in lymphocytes of young adults. *Am. J. Hum. Genet.*, 27, 419-429.

van Rensburg, E.J., W.K.A. Louw, H. Izatt, J.J. van der Watt (1985): DNA supercoiled domains and radiosensitivity of subpopulations of human peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 47, 673-679.

Vanderkerken, K., P. Vanparys, L. Verschaeve, M. Kirsch-Volders (1989): The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis*, 4, 6-11.

Verhaegen, F., A. Vral (1994): Sensitivity of micronucleus induction in human lymphocytes to low LET radiation qualities: RBE and correlation of RBE and LET. *Radiation Res.*, 139, 208-213.

Verhaegen, F., A. Vral, J. Seuntjens, N.W. Schipper, L. de Ridder, H. Thierens (1994): Scoring of radiation-induced micronuclei in cytokinesis-blocked human lymphocytes by automated image analysis. *Cytometry*, 67, 193-202.

Vral, A., H. Thierens, L. de Ridder (1992): Study of dose rate and split dose effects on the in vitro micronucleus yield in human lymphocytes exposed to X-rays. *Int. J. Rad. Biol.*, 61, 777-784.

Vral, A., H. Thierens, L. de Ridder (1997): In vitro micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 71, 61-68.

Vral, A., F. Verhaegen, H. Thierens, L. de Ridder (1994a): Micronuclei induced by fast neutrons versus  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays in human peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Rad. Biol.*, 65, 321-328.

Wasserman, J., E. Baral, G. Biberfeld, H. Blomgren, B. Petrini, L.-V. von Stedingk, L.-E. Strender (1981): Effect of in vitro irradiation on lymphocyte subpopulations and cytotoxicity, in: J.B. Dubois, B. Serrou, C. Rosenfeldt (Eds.), *Immunopharmacologic Effects of Radiation Therapy*, Raven Press, New York.

Weissenborn, U., C. Streffer (1988): The one-cell mouse embryo: cell cycle-dependent radiosensitivity and development of chromosomal anomalies in postradiation cell cycles. *Int. J. Radiat. Biol.*, 54, 659-674.

Weissenborn, U., C. Streffer (1989): Analysis of structural and numerical chromosomal aberrations at the first and second mitosis after X-irradiation of two-cell mouse embryos. *Radiat. Res.*, 117, 214-220.

Weissenborn, U., C. Streffer (1991): Micronuclei with kinetochores in human melanoma cells and rectal carcinomas. *Int. J. Radiat. Biol.*, 59, 373-383.

Willard, H.F.(1990): Centromeres of mammalian chromosomes. *Trends in Genetics*, 6, 410-415.

Wuttke, K., C. Streffer, W.-U. Müller (1993): Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes. *Mut. Res.* 286, 181-188.

Wuttke, K., H.-W. Gantenberg, W.-U. Müller, C. Streffer (1991): Micronuclei in human lymphocytes irradiated in vitro and in vivo. *Radiat. Res.*, 9 th ICCR Toronto (Hrsg: J.D. Chapman, W.C. Dewey, G.F. Whitmore).

Wuttke, K.: Dissertation im Fachbereich Medizin der Universität Gesamthochschule Essen, Inst. f. Med. Strahlenbiologie: Mikronuklei in Lymphocyten als biologischer Indikator für Strahlenexpositionen (1993).

Yager, J.W. (1990): The effect of background variables on human peripheral lymphocyte micronuclei. *IARC Sci. Publ.*, 104, 147-150.

Yamamoto, K., Y. Kikuchi (1980): A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Res.*, 71, 127-131.