

Zivilschutz- Forschung

Schriftenreihe der Schutzkommission beim Bundesminister des Innern
Herausgegeben vom Bundesamt für Zivilschutz Neue Folge Band 12

Hans Mönig, Wolfgang Pohlitz, Ernst Ludwig Sattler

Biologische Dosimetrie

ISSN 0343-5164

Zivilschutz- Forschung

Schriftenreihe der Schutzkommission beim Bundesminister des Innern

Herausgegeben vom Bundesamt für Zivilschutz Neue Folge Band 12

Hans Mönig, Wolfgang Pohlitz, Ernst Ludwig Sattler

Biologische Dosimetrie

ISSN 0343-5164

Herausgeber: Bundesamt für Zivilschutz,
Deutscherherrenstraße 93-95, 53177 Bonn
Schriftleitung und Redaktion: Carl Maier

Die Arbeiten geben die Meinung der Autoren wieder. Sie stellt keine
Äußerung des Herausgebers dar und ist auch nicht als solche auszulegen.

Inhalt

- I. Einleitung: Dosisabschätzung mit Hilfe der Biologischen Dosimetrie**
 - Hans Mönig, Wolfgang Pohlit, Ernst Ludwig Sattler.* 11
 - Einführung zum Begriff „Biologische Dosimetrie“ ionisierender Strahlung. 11
 - Biologische Dosimetrie im Katastrophenfall 13
 - Kann die Ermittlung der Ortsdosis die Biologische Dosimetrie ersetzen? 15
 - Biologische Indikatoren für eine Dosimetrie. 16

- II. Ermittlung der Strahlenexposition aus Messungen an Retikulozyten**
 - Hans Joachim Egner, Wolfgang Pohlit, Eckart Werner.* 23
 - Biologische und physikalische Grundlagen 23
 - Erythropoese. 23
 - Versuchstiere. 24
 - Beschreibung des Durchflußzytometers. 26
 - Das hydrodynamische System. 26
 - Das optische System. 28
 - Modifikationen des optischen Systems. 29
 - Signalverarbeitung. 32
 - Modifikationen des Signalprozessors. 34
 - Bestrahlungsanlage und Dosimetrie. 34
 - Bestimmung des Retikulozytenwertes. 35
 - Definition des Retikulozytenwertes. 35

Mikroskopische Bestimmung des Retikulozytenwertes.	36
Durchflußzytometrische Methoden zur Bestimmung des Retikulozytenwertes.	36
Bestimmung des Retikulozytenwertes mit dem Mikroskop	39
Durchflußzytometrische Messung des Retikulozytenwertes im peripheren Blut des Kaninchens.	40
Farbstoff.	40
Färbung.	42
Messung.	42
Kalibrierung.	45
Vergleich der durchflußzytometrischen Methode mit den Ergebnissen einer Auswertung mit dem Mikroskop; Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Messung.	45
Durchflußzytometrische Messung des Retikulozytenwertes im peripheren Blut des Menschen.	48
Farbstoff.	48
Anfärbung der Blutzellen.	48
Messung.	49
Vergleich der durchflußzytometrischen Methode mit den Ergebnissen einer Auswertung mit dem Mikroskop; Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Messung.	52
Beeinflussung der Meßergebnisse.	54
Retikulozytenwert im Blut von Kaninchen nach Bestrahlung	55
Vorbemerkung.	55
Statistische Methoden.	58
Die Log-Normalverteilung.	58
Fehlerfortpflanzung.	60
Retikulozytenwert bei unbestrahlten Kaninchen.	61
Inter-individuelle Variation des Retikulozytenwertes	61
Intra-individuelle Variation des Retikulozytenwertes	62
Retikulozytenwert bei Kaninchen nach einer Ganzkörperbestrahlung.	66
Meßergebnisse bei den einzelnen Versuchstieren. . .	66
Median R der Retikulozytenwerte sämtlicher Versuchstiere in Abhängigkeit von der Zeit.	67

Möglichkeiten und Grenzen einer Dosisabschätzung durch Messung des Retikulozytenwertes	70
Median R_3 der Retikulozytenwerte sämtlicher Versuchstiere am dritten Tag nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Dosis.	70
Relative Abnahme der Retikulozytenwerte R_3/R_0 am dritten Tag nach Bestrahlung in Abhängigkeit der Dosis	71
Retikulozytenwert bei Kaninchen nach einer Teilkörperbestrahlung	74
Vorbemerkung	74
Verteilung des erythropoetisch aktiven Knochenmarks in den einzelnen Knochen des Kaninchens	75
Meßergebnisse der einzelnen Versuchstiere	76
Median R der Retikulozytenwerte sämtlicher Versuchstiere in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlung	77
Altersverteilung von Retikulozyten nach Bestrahlung	80
Vorbemerkung	80
Analyse der Fluoreszenzverteilungen von Retikulozyten nach AO-Färbung	81
Abhängigkeit des Medians der Fluoreszenzverteilung von der Zeit nach Bestrahlung	81
Interpretation der Daten mit Hilfe eines einfachen Modells	84
Änderung der Anteile von Retikulozyten in verschiedenen Altersklassen	86
Analyse der Fluoreszenzverteilungen von Retikulozyten nach TO-Färbung	87
Abhängigkeit des Medians der Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten von der Zeit nach Bestrahlung	91
Änderung der Anteile von Retikulozyten in verschiedenen Altersklassen	92
Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	93
Konsequenzen dieser Untersuchungen für eine mögliche Biologische Dosimetrie nach Ganzkörperbestrahlung	97
Retikulozytenwert beim Menschen	98
Vorbemerkung	98

Retikulozytenwert im Blut gesunder Probanden104
Inter-individuelle Variation des Retikulozytenwertes	104
Intra-individuelle Variation des Retikulozytenwertes	105
Retikulozytenwert bei Patienten während einer Strahlen- therapie109
Möglichkeiten und Grenzen einer Dosisabschätzung beim Menschen112
Vorbemerkung112
Dosisabschätzung beim Menschen115
Allgemeine Berechnung115
Empfehlung für eine Sichtung im Katastrophenfall	124
Dosisabschätzung für weitere therapeutische Maß- nahmen in einer Klinik125
Zusammenfassung127
Literaturverzeichnis127
Zitierte Literatur127
Weitere Literatur132
1. Hämatologische Untersuchungen über Retikulo- zyten132
2. Hämatologische Untersuchungen über Strahlen- wirkungen132
3. Automatische Zählung von Retikulozyten136
4. Eisenaufnahme in Retikulozyten136
Die Autoren137

III. Strahlenbedingte Änderung der Chemilumineszenz von Granulozyten als biologischer Dosisindikator

<i>Hans Mönig, Gerhard Konermann.</i>139
Einführung139
Material und Methoden140

Tiere	140
Chemikalien und Reagenzien	142
Bestrahlung	143
Messung der Chemilumineszenz in verdünntem Vollblut	145
Ergebnisse	148
Einfluß verschiedener Parameter auf die Chemilumineszenz – Ausbeute	148
Luminol und Lucigenin	148
Einfluß der Blutmenge	149
Einfluß der Luminolkonzentration	150
Einfluß der Zymosankonzentration	151
Einfluß eines Breitbandantibiotikums	151
Einfluß einer in vitro Gammabestrahlung des Vollbluts auf die Chemilumineszenz	152
Ganzkörperbestrahlung	153
Dosis von 1 Gray	153
Einfluß des Blutserums auf die CL	156
Einfluß des Calciums im Blutserum auf die CL	157
Dosisbereich von 2 bis 8 Gray	158
Zeitabhängigkeit	158
Korrelation zwischen Granulozyten und CL	159
Dosisabhängigkeit	162
Einfluß der Dosisleistung bei Ganzkörperbestrahlung	163
Teilkörperbestrahlung	168
Einfluß einer Cystamin-Gabe	170
Diskussion und Schlußfolgerung	173
Zusammenfassung	177
Literatur	177
Die Autoren	180
Danksagung	180

IV. Zellmembranänderungen als biologische Dosisindikatoren
Strahleninduzierte Membranänderung im subletalem Bereich
Immunbindungsreaktionen an Lymphozyten
Paul Bidoriy, Gerhard Doll, Burghard Fehrle, Ernst Ludwig
Sattler, Georg Seibold, Bruno Vogt. 181

Einleitung 181

Material und Methoden. 182

Ergebnisse. 185

Diskussion. 191

Literatur. 198

Die Autoren. 200

I. Einleitung: Dosisabschätzung mit Hilfe der Biologischen Dosimetrie

Hans Mönig, Wolfgang Pohlit, E. L. Sattler

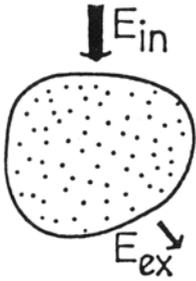
Einführung zum Begriff „Biologische Dosimetrie“ ionisierender Strahlung

Die Dosimetrie dient der meßtechnischen Bestimmung der Energiedosis D . Diese ist durch den Quotienten aus der durch Strahlung auf das Objekt übertragenen Energie und der Masse definiert (s. Abb. 1.1). Die Energiedosis kann mit physikalischen und chemischen Methoden bestimmt werden. Die gebräuchlichsten Verfahren sind die Messung der Luftionisation, der photographischen Schwärzung und der Thermolumineszenz. In allen diesen Verfahren ist der Zusammenhang zwischen der Energiedosis und der zur Messung benutzten Strahlenwirkung im Detektor sehr genau und eindeutig bekannt. Mit derartigen Dosimetern läßt sich die Energiedosis in einer Person als „*Personendosis*“ oder an einem Ort als „*Ortsdosis*“ ermitteln.

Für Strahlenschutz Zwecke kann die unterschiedliche biologische Wirksamkeit verschiedener Strahlenarten durch einen Qualitätsfaktor berücksichtigt werden. Durch Multiplikation der Energiedosis D mit dem Qualitätsfaktor Q ergibt sich dann die Äquivalentdosis H .

Durch eine Teilkörperbestrahlung von außen oder durch Anreicherung eines Radionuklids in einem einzelnen Organ ist eine sehr inhomogene Bestrahlung eines Menschen möglich. Der Beitrag der Bestrahlung der einzelnen Organe zum Gesamtrisiko für stochastisch bedingte Strahlenschäden (z.B. Tumorentstehung) wird durch Wichtungsfaktoren W_T berücksichtigt. Die Summation aller Einzelanteile der Äquivalentdosis in verschiedenen Organen H_T multipliziert mit den Wichtungsfaktoren w_T ergibt die »Effektive Dosis H_E « (s. Abb. 1.1). Bei der Äquivalentdosis und der effektiven Dosis wird also die biologische Wirkung der Strahlung beim Menschen berücksichtigt. Beide Größen werden nur im Strahlenschutz angewendet.

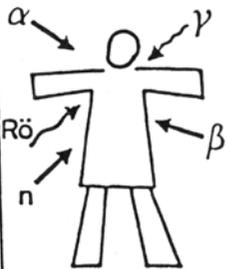
Für die Ermittlung der Personendosis muß vorausgesetzt werden, daß ein Dosimeter während der gesamten Bestrahlungsdauer von der betroffenen Person getragen wurde. Das ist aber in Unfallsituationen nur selten der Fall. Deshalb besteht der Bedarf, aus biologischen Verände-



ENERGIEDOSIS (D)

$$D = \frac{\text{übertragene Energie}}{\text{Masse (Materie)}}$$

Einheit: 1J/kg = 1 Gray (Gy)



ÄQUIVALENTDOSIS (H)*

$$H = Q \cdot D$$

Q = Qualitätätfaktor

$1 \leq Q \leq 20$, $Q = 1$ f. γ -Strahlen

Relative biologische Wirksamkeit

Einheit: 1J/kg = 1 Sievert (Sv)



Stochastisches Risiko

EFFEKTIVE DOSIS (H_E)*

$$H_E = \text{Summe } (w_T \cdot H_T)$$

w_T = Wichtungsfaktor f. Gewebe T

$0,03 \leq w_T \leq 0,25$

Einheit: 1J/kg = 1 Sievert (Sv)

* nur für den Strahlenschutz

nur für den Strahlenschutz

Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Energiedosis, der Äquivalentdosis und der Effektiven Dosis.

rungen im bestrahlten Körper die erhaltenen Strahlendosis zu ermitteln. Das ist die Hauptaufgabe der „Biologischen Dosimetrie“.

Im Jahre 1982 fand das erste Symposium über „Biologische Dosimetrie“ in Neuherberg bei München statt. Die dort vorgetragenen Themen erschienen unter dem Titel „Biological Dosimetry“ (Eisert, Mendelsohn, 1984). Nach einer im Vorwort des Tagungsbandes gegebenen Definition beschreibt die Biologische Dosimetrie die Dosis in Begriffen einer definierten biologischen Antwort. Es ist zu beachten, daß der Begriff der Biologischen Dosimetrie auch im Zusammenhang mit toxischen Stoffen verwendet wird. Unter dem gleichen Aspekt fand im Jahre 1990 in Lercici, Italien, ein weiteres internationales Symposium mit dem Titel „Trends in Biological Dosimetry“ statt (Mauro et al., 1990). In dem Tagungsband werden vor allem zytogenetische Wirkungen, wie z. B. Chromosomenaberrationen und die Bildung von Mikronuklei, in Abhängigkeit von der Dosis behandelt. Die Chromosomenaberrations-Analyse ist inzwischen gut eingeführt und findet bei Dosisüberschreitung beruflich strahlenexponierter Personen Anwendung. In einem Rundschreiben des Bundesminister des Innern (BMI 1983) werden die Modalitäten der Strahlenschutzkontrolle mit diesem Verfahren angegeben. Diese Untersuchung kann jedoch für eine sehr große Anzahl von Personen nicht eingesetzt werden; sie ist sehr zeitaufwendig und arbeitsintensiv. Eine ähnliche Einschränkung gilt auch für andere zu Strahlenschutz Zwecken eingeführte Methoden.

Anstelle der Bezeichnung „Biologische Dosimetrie“ wird in dem genannten Rundschreiben des Bundesministers des Innern der Begriff „biologische Indikatoren“ verwendet. Auch das Bundesgesundheitsamt bezeichnet in seinen Schriften zum Nachweis von Strahlenexpositionen die strahlenbedingten Veränderungen in Zellen, Geweben, Organen oder Körperflüssigkeiten mit dem Begriff „biologische Indikatoren“ (s.z.B. Kaul et al., 1986).

Biologische Dosimetrie im Katastrophenfall

Bei Unfällen in kerntechnischen Anlagen oder beim Einsatz von Nuklearwaffen muß damit gerechnet werden, daß große Teile der Zivilbevölkerung Strahlenexpositionen in unterschiedlichem Ausmaß ausgesetzt sind. In Abb. 1.2 ist die Häufigkeit des Auftretens von Übelkeit und Erbrechen als Symptome der Strahlenkrankheit und von Todesfällen innerhalb von 60 Tagen, durch Schädigung des Knochenmarks, in Abhängigkeit von der Dosis aufgetragen. Der Abbildung kann entnommen werden, daß unterhalb einer Strahlenbelastung mit einer Dosis von

Häufigkeit (%)

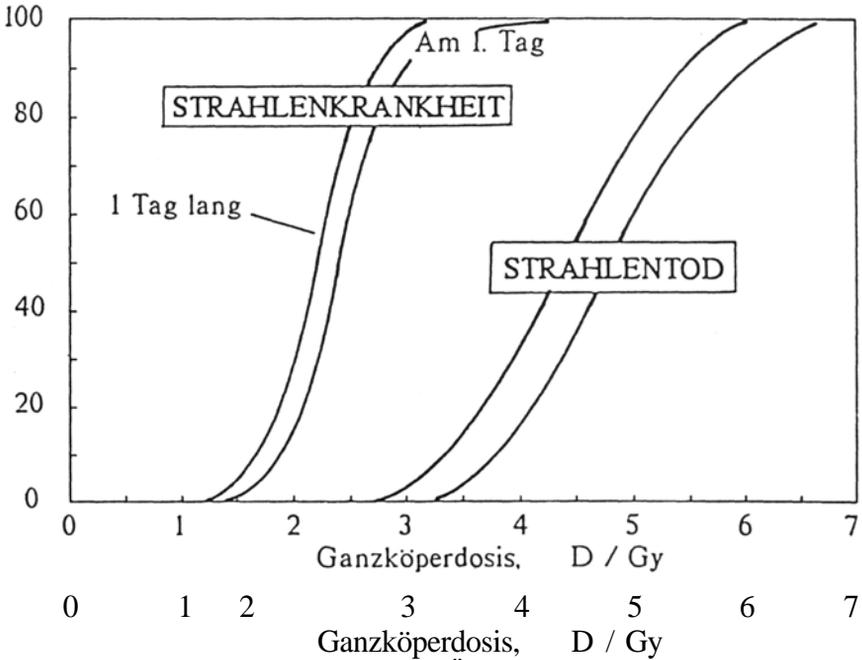


Abb. 1.2 Auftreten der Strahlenkrankheit mit Übelkeit und Erbrechen und des Strahlentodes durch Schäden in den Blutstammzellen nach Ganzkörperexposition mit locker ionisierenden Strahlen.

1 Gray kaum Auswirkungen zu erwarten sind. Andererseits muß bei einer kurzzeitigen Ganzkörperexposition mit einer Dosis von 6 Gray ohne medizinische Behandlung mit fast 100 % Todesfällen gerechnet werden. Die klinisch relevanten Strahlenwirkungen liegen also innerhalb eines relativ engen Dosisbereichs. Für eine medizinische Behandlung ist die Feststellung der von jedem einzelnen empfangenen Dosis von entscheidender Bedeutung. Dies gilt insbesondere für die Entscheidung der Frage, welchem der Strahlenopfer Knochenmark transplantiert werden kann. Eine Bedingung dafür ist, daß das Knochenmark des Bestrahlten letal geschädigt ist, daß jedoch die anderen Gewebe keine letale Schädigung erfahren haben (Champlin, 1988). Aus den Erfahrungen mit den Strahlenopfern aus Tschernobyl wird gefolgert, daß erst bei einer Dosis von mehr als 7 bis 8 Gray zu einer Transplantation geraten werden kann (Champlin, 1987). Eine weitere Voraussetzung ist, daß innerhalb der kritischen Phase immunkompetente Spender verfügbar sind.

Kann die Ermittlung der Ortsdosis die Biologische Dosimetrie ersetzen?

Für die Entscheidung zu einer Therapie ist es von Vorteil, wenn Angaben über Ortsdosen [Die Ortsdosis ist nach DIN 6814 (Teil 3) und nach der Strahlenschutzverordnung 1989 definiert als Äquivalentdosis für Weichteilgewebe, gemessen an einem bestimmten Ort] gemacht werden können. Untersuchungen an Haushaltszuckern, die nach Bestrahlung bei der Lösung in Wasser Lumineszenzlicht emittieren (Lyolumineszenz), haben gezeigt, daß es möglich ist, flächendeckend Ortsdosen zu ermitteln (Koch et al., 1988). Die Festlegung einer Personendosis auf Grund einer Messung der Ortsdosis oder Ortsdosisleistung setzt allerdings voraus, daß die betreffende Person weiß, an welcher Stelle sie sich zum Zeitpunkt der Exposition befand und wie lange sie sich dort aufgehalten hat. Welche Schwierigkeiten sich für diese Fragestellung ergeben können, zeigen dosimetrische Messungen an Zähnen von Atombombenopfern in Hiroshima und Nagasaki (s. Tabelle 1.1). Man erkennt, daß zwischen den Werten der Gewebe-Kerma in Luft aus der Entfernungsangabe und den Dosiswerten aus den ESR-Messungen an den Zähnen z. T. erhebliche Abweichungen bis zu einem Faktor von etwa 15 bestehen. Solche Diskrepanzen zwischen der tatsächlich aufgenommenen Dosis und der ermittelten Ortsdosis können für den Betroffenen hinsichtlich der ärztlichen Betreuung von Bedeutung sein. Es

Tabelle 1.1 Gewebe-Dosis von Atombomben-Opfern in Japan nach Abschätzung mit Hilfe der Elektronenspinresonanz (ESR)-Methode an Zähnen. Im Hydroxylapatit der Zahnhartsubstanz entstehen durch eine Bestrahlung langlebige freie Radikale. N= Nagasaki/H = Hiroshima. Nach Tatsumi-Miyajima (1987).

Proben-Nr.	Ort	Direkte Entfernung (m)	Gewebe-Kerma in Luft (Gy) ^{a)}	Aufenthalt	Dosis nach der ESR-Methode (Gy) () = Fehler in %
1	N	855	33,5	im Beton-Haus	2,2 (± 13 %)
2	N	158–1074	11,5–0,84	im Freien?	8,5 ^{b)} (± 9 %)
3	N	1301	3,70	im Haus (Leichtbauweise)	0,9 (± 55 %)
4	N	1394	1,89	im Holzhaus	3,4 (± 7 %)
5	H	985–1151	0,89–0,17	im Beton-Haus	2,7 (± 21 %)
6	H	1090	4,69	im Holzhaus	5,4 (± 7 %)

a: Nach Berechnungen von Kerr et al. (1983). Kerma (= Kinetic energy released in material) ist eine Dosisgröße,

b: Der Mann starb 7 Tage nach dem Atombombenabwurf

muß darauf hingewiesen werden, daß die ESR-Methode nur in Einzelfällen angewendet werden kann; sie ist von der präparativen und meßtechnischen Seite her sehr aufwendig. Diese Feststellung gilt auch für die von Ikeya und Kai (1988) vorgeschlagene ESR-Untersuchung von bestrahlten kommerziellen Medikamenten, die Unfallopfer bei sich getragen haben.

Biologische Indikatoren für eine Dosimetrie

Die Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Zusammenhängen für biochemische, histologische, zytologische und morphologische Veränderungen sowie Änderungen in Zellpopulationen gehört zu den Grundlagen strahlenbiologischer Untersuchungen. Es ist naheliegend, bei geeignetem Verlauf der Dosis-Wirkungs-Beziehung gewisse Rückschlüsse auf die Höhe der Strahlenexposition des Organismus zu ziehen. Als biologische Veränderungen, aus denen auf eine erhaltene Strahlendosis zurückgeschlossen werden kann, kommen im Prinzip alle betroffenen biologischen Funktionen im menschlichen Körper in Betracht. Tabelle 1.2

Tabelle 1.2 Biologisch-biochemische Indikatoren der Strahlenschädigung, die zur Abschätzung der Strahlendosis dienen können.
Nach Waiden und Farzaneh, 1990.

Blutserum

Amylase	Glucose	Nucleinsäuren:
A-T-Phosphatase	Histamin	Desoxycytidin
β-Galaktosidase	Immunglobuline	Pseudouridin
Calcium	Katalase	Thymidin
Catecholamine	Kreatin	Uracil
Diamin-Oxidase	Lactat-dehydrogenase	Plasmafreies
Eisenaufnahme in	Lipide:	Haptoglobin
Erythrozyten	Cholesterin	Plasmafreies
Faktor XXII	Corticosteroide	Hämoglobin
Freie Aminosäuren:	Phospholipide	Prostglandine
Leucin	Triglyceride	Saure Phosphatase
Phenylalanin	Lipoproteine	Saure
Prolin	Lysylaminopeptidase	Desoxyribonuklease
Tyrosin		Transaminasen
		Zink-Protoporpyrin

Urin

Aminosäuren:	Amylase
Asparaginsäure	β-Aminoisobutter-
Cysteinsäure	säure

Glycin und Metabolite	Catecholamine
Kreatin, Kreatinin	Desoxyribonuklease
Hydroxyprolin	Histamin
Leucin	5-Hydroxyindolessigsäure
Phenylalanin	Indoxylschwefelsäure
Prolin	17-Ketosteroide
Threonin	Nucleinsäuren:
Metabolite von Tryptophan	Desoxycytidin
Kynurensäure	Pseudouridin
Xanthurensäure	Prostaglandine
Valin	Ribonukleasen
Taurin	Serotonin

Speichel

Albumin
Amylase

Zytologie

Periphere Blutzellen
Vollständiges Blutbild und Differentialblutbild
Chromosomenanalyse
Zählung von Spermien und Erfassung der Anomalien
Antigen-Bestimmung

Physiologische Parameter

Epilation
Erythem
Fieber
Schwächezustand
Konvulsionen
Körpertemperatur
Prodromale Symptome:
Nausea
Emesis
Diarrhoe
Anorexie

gibt eine Übersicht über fünf Gruppen von biologisch-biochemischen Reaktionen. Für die hier vorliegenden Probleme von Strahlenunfällen und Katastrophensituationen besteht aber die zusätzliche Anforderung, daß die entsprechenden Strahlenreaktionen im Körper einfach und schnell meßbar sein müssen. Außerdem müssen sie hinreichend empfindlich sein, damit eine Strahlenbelastung im interessierenden Dosisbereich von einigen Gray erfaßt werden kann.

Von medizinischer Seite hat man Stufenpläne entwickelt, um den Schweregrad der Strahlenschädigung zu ermitteln. Diese Stufenpläne können in gewisser Weise auch als biologische Dosimetrie angesehen werden. Um den Verlauf der subjektiven und objektiven Symptomatik innerhalb der ersten 24 bis 48 Stunden nach der Strahlenexposition zu überwachen, wurde vorgeschlagen, die Veränderung der Blutlymphozytenzahlen zu ermitteln, um zu einer ersten Einteilung der Strahlengeschädigten zu kommen (Wendt, 1980). In Abb. 1.3 ist eine Einteilung in vier Gruppen nach der Anzahl der Blutlymphozytenwerte innerhalb der ersten 48 Stunden wiedergegeben. Wendt (1986) hat jedoch auch darauf aufmerksam gemacht, daß die Lymphozytenzahl zwar ein guter

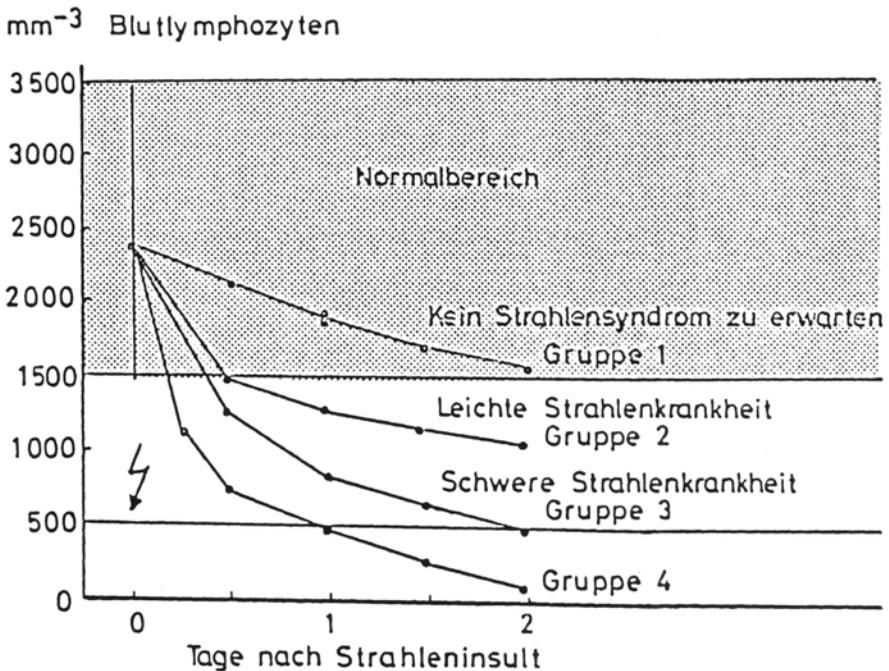


Abb. 1.3 Zeitlicher Verlauf der Blutlymphozyten beim reinen Strahlensyndrom. Wendt, 1980.

Gradmesser für die Frühdiagnostik des Strahlenschadens ist, jedoch keinen Indikator für die Schädigung des Stammzell-Systems insgesamt darstellt. Diese Einschätzung folgt u. a. aus einem Vergleich der Blutwerte nach Ganzkörper- und nach Teilkörper-Bestrahlung. So kann die Lymphozytenzahl auch durch andere Einflüsse verändert sein.

Die klinischen und hämatologischen Kriterien bestimmen nicht nur die diagnostische Beurteilung, sondern auch die Anpassung an die jeweiligen Erfordernisse des Behandlungskonzepts. Es entspricht einem Stufenplan der Entscheidungsbildung, wofür eine sequentielle Diagnostik des Strahlenschadens (s. Abb. 1.4) vorgeschlagen wurde (Wendt, 1980; Fliedner, 1981). Aufgrund klinischer Befunde sind natürlich nicht Dosisangaben, sondern nur Aussagen über Schweregrade einer Strahlenschädigung möglich, wie sie in der Tabelle 1.3 angegeben werden. Die Schweregrade „leicht“, „mittel“, „schwer“ und „äußerst schwer“ ent-Tabelle 1.3 Differenzierung der akuten Strahlenkrankheit nach Schweregraden in Abhängigkeit vom Auftreten der Primärreaktion (Aus: Vorobev, 1975 und Messerschmidt, 1984).

Schweregrad	Hauptsymptom Erbrechen (Zeitpunkt d. Auftretens und Dauer	Indirekte Symptome			
		Allgemeine Schwäche	Kopfschmerz u. Zustand des Bewußtseins	Körpertemperatur	Hauthyperämie und Konjunktivalinjektion
leicht	kein oder nach 3 Std. einmaliges Erbrechen	leicht	kurzzeitiger Kopfschmerz, klares Bewußtsein	normal	möglicherweise sehr leichte Konjunktivalinjektion
mittel	1,5 bis 3 Std. danach 2mal und häufiger	mäßig	ständiger Kopfschmerz, klares Bewußtsein	normal oder subfebril	Hauthyperämie und Konjunktivalinjektion
schwer	nach 30 min bis 1,5 Std. mehrmals	ausgeprägt	ständiger starker Kopfschmerz, klares Bewußtsein	normal oder subfebril	ausgeprägte Hauthyperämie und Konjunktivalinjektion

Tabelle I.3 Fortsetzung

Schwere- grad	Haupt- symptom Erbrechen (Zeitpunkt d. Auftre- tens und Dauer	Indirekte Symptome			
		Allge- meine Schwäche	Kopf- schmerz u. Zustand des Be- wußtseins	Körper- tempe- ratur	Hauthyper- ämie und Konjunk- tivalinjek- tion
äußerst schwer	nach 10 bis 30 min un- stillbares Erbrechen	stark ausge- prägt	bohrender starker Kopf- schmerz, Bewußtsein kann ge- trübt sein	subfebril oder febril	starke Hauthyper- ämie und Konjunkti- valinjektion

sprechen in etwa den Dosisbereichen 1 bis 2 Gray, 2 bis 4 Gray, 4 bis 6 Gray und mehr als 6 Gray (Messerschmidt, 1984). Eine ausführliche Darstellung der klinischen Frühdiagnostik von Strahlenwirkungen beim Menschen mit Therapievorschlügen wurde von der Schutzkommission in ihrem katastrophenmedizinischen „Leitfaden“ im Kapitel „Ärztliche Maßnahmen bei Strahlenunfällen und Strahlenkrankheiten“ (SK, 1991) gegeben. Danach ist es insbesondere wichtig festzustellen, ob ein Mensch eine Strahlendosis von mehr als 3 Gray erhalten hat oder nicht. Diese Einschätzung des „klinischen Bildes“ der Strahlenkrankheit setzt große Erfahrungen des Arztes voraus. Es kommt hinzu, daß eine Reihe von Faktoren das „klinische Bild“ erheblich beeinflussen können.

Es besteht daher Bedarf nach biologischen Meßverfahren, die eine möglichst rasche, hinreichend sichere und quantitative Ermittlung einer Strahlenbelastung bei einer möglicherweise großen Anzahl betroffener Menschen erlaubt. Die Schutzkommission hat in einem kooperativen Arbeitsprogramm verschiedene Wege einer »Biologischen Dosimetrie« experimentell verfolgt. Die Berichte der Arbeitsgruppen an den Universitäten Frankfurt am Main, Freiburg i. Br. und Gießen werden hier zusammenfassend dargestellt.

Erste Stunden		Tag 1-4	Tag 5-8	Woche 2	Woche 3	Woche 4 und 5	Woche 6 und 7	
Alle möglich exponierten Personen kommen zur Untersuchung	1	S.: initial keine L.: Ly normal Med.: <u>ambulant</u> Progn.: günstig	keine Symptome normal ambulant günstig	keine normal ambulant günstig	keine normal ambulant günstig	keine normal ambulant günstig	keine normal ambulant günstig	
	2	S.: initial mäßig Schwindel, Übel- keit, Erbrechen L.: Ly über 500/mm ³	keine Symptome über ca. 500/mm ³	keine Symptome über ca. 500/mm ³ Gr. mäßig vermind. Thr. mäßig vermind.	keine Symptome über ca. 500/mm ³ Gr. sinkend Thr. sinkend	keine Symptome über ca. 500/mm ³ Gr. Minimum Thr. Minimum bd. ansteigend	keine Symptome über ca. 500/mm ³ Gr. }steigernd bis- Thr. } Normalbereich	
	3	S.: initial schwer Schwindel, Er- brechen unstillb. Diarrhoe, ZNS-Unruhe, Schock, Erythem L.: Ly nahe 0 Gr. stark erhöht	Zunahme von Schwindel, Er- brechen, Diarrhoe, Fieber, Ileus unter ca. 500/mm ³ Gr. erniedrigt Thr. indiff.	Fieber, Infekte haemorrh. Diathese evt. GIT-Symptome unter ca. 500/mm ³ Gr. stark erniedr. Thr. stark erniedr. <u>ohne Anstiegstendenz</u>	Fieber, Infekte haemorrh. Diathese unter ca. 500/mm ³ Gr. stark erniedr. Thr. stark erniedr. <u>nach Anstieg 2. Woche</u>	Fieber, Infekte haemorrh. Diathese unter ca. 500/mm ³ Gr. stark erniedr. Thr. stark erniedr.	Fieber, Infekte haemorrh. Diathese unter ca. 500/mm ³ Gr. stark erniedr. Thr. stark erniedr.	Womöglich Weiterbehandlung der Transplantations- situation
		Med.: stat. Beobacht. keine Therapie Progn.: unsicher	stat. Beobacht. keine Therapie unsicher	stat. Beobacht. keine Therapie unsicher	stat. Beobacht. keine Therapie unsicher	stat. Beobacht. keine Therapie günstig	stat. → ambul. keine Therapie günstig	
		Med.: stat. Intensiv ther. palliativ & symptomat.	Intensiv; sympt. protekt. Isolierung Entkeimung Stammzellen- Transplantation	Intensiv; Substitit. v. Thrombozyten, prot. Isolierung, Entkeimung, Infektbekämpfung, Stammzellen- Transplantation	Intensiv; Substitit. v. Thromboz., Infekt- bekämpfung; protekt. Isolierung, Entkeimung, evtl. Stammzellen- transfusion	Intensiv; Substitit. v. Thromboz., Infekt- bekämpfung; protekt. Isolierung, Entkeimung		
		Progn.: ungünstig in 2-3 Tagen	ungünstig	zweifelhaft	noch zweifelhaft	unsicher		

Abb. 14 Sequentielle Diagnostik des Strahlenschadens. Wendi, 1980.

Literatur

- BMI: Strahlenschutzkontrolle mittels biologischer Indikatoren: Chromosomenaberrationsanalyse beim Institut für Strahlenhygiene des Bundesgesundheitsamtes. Rdschr. d. BMI. GMBI S. 176 (1983).
- Champlin, R.: The role of bone marrow transplantation for nuclear accidents: Implications of the Chernobyl disaster. *Sem. Hematol.* 24:1-4 (1987).
- Champlin, R.: Treatment for victims of nuclear accidents: The role of bone marrow transplantation. *Radiat. Res.* 113: 205-210 (1988).
- Eisert, W. G., M. L. Mendelsohn (Eds.): *Biological Dosimetry*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (1984).
- Fliedner, T. M.: Strategien zur strahlenschutzmedizinischen ambulanten Versorgung von „Betroffenen“ bei kerntechnischen Unfällen. *Strahlenschutz in Forschung und Praxis* 22:71-82(1981).
- Ikeya, M., A. Kai: Drug tablets Glycyrrhizin and trapidil as ESR radiation dosimeter. *Chemistry Expr.* 3: 699-702 (1988).
- Kaul, A., A. Dehos, W. Bögl, G. Hinz, F. Kossei, E.-R. Schwarz, A. Stamm, G. Stephan (Eds.): *Biological Indicators for Radiation Dose Assessment*. bga-Schriften 2/86. MMV Medizin Verlag, München 1986.
- Kerr, G. D., J. V. Pace, W. H. Scott: Tissue kerma vs. distance relationships for initial nuclear radiation from the atomic bomb. In: *Hiroshima and Nagasaki, Reassessment of Atomic Bomb Radiation Dosimetry in Hiroshima and Nagasaki* (D. J. Thompson, ed.). pp 57-99. Radiation Effects Research Foundation, Hiroshima (1983).
- Koch, M., T. Nickel, E. Pitt, A. Scharmann: Katastrophendosimetrie. Dosisabschätzung mit Hilfe der Lyolumineszenz von Zucker. *Zivilschutzforschung Band 21: 191-223* (1988).
- Mauro, F., F. Pacchierotti, M. Spanö, B. L. Gledhill, J. S. Feiton, M. Vanderlaan (Organizers): *Trends in Biological Dosimetry. An International Symposium. October 22-27, 1990. Lerici (La Spezia), Italy.*
- Messerschmidt, O.: *Biologische Folgen von Kernexplosionen*. Perimed-Verlag, Erlangen 1984.
- SK (Schutzkommission beim BMI): *Katastrophenmedizin. Leitfaden für die ärztliche Versorgung im Katastrophenfall*. Bonn 1991.
- Tatsumi-Miyajima, J.: ESR dosimetry for atomic bomb survivors and radiologic technologists. *Nuclear Instrum. Meth. Phys. Res. A257: 417-422* (1987).
- Vorobev, A. L.: Instruktionen zur medizinischen Selektion der bei Strahlenhaverien betroffenen Personen. Instruktionen zur Behandlung der akuten Strahlenkrankheit. In: *Handbuch für medizinische Fragen des Strahlenschutzes*. Moskau 1975. Zitiert nach O. Messerschmidt (1984).
- Waiden, T.L., N. K. Farzaneh: *Biochemistry of Ionizing Radiation*. Raven Press, New York 1990.
- Wendt, F.: Behandlung des Strahlensyndroms. *Strahlenschutz in Forschung und Praxis* 21: 230-242(1980).
- Wendt, F.: Strahlenempfindlichkeit und Erholung der Zeilerneuerungssysteme. *Zivilschutz-Forschung Band 18: 48-51* (1986).

Ermittlung der Strahlenexposition aus Messungen an Retikulozyten

Hans Joachim Egner, Wolfgang Pohlitz, Eckhard Werner

Retikulozyten sind für eine biologische Dosimetrie im Dosisbereich von 1 bis 8 Gy sehr gut geeignet. Sie zeigen eine dosisabhängige Abnahme mit einer Minimalzahl am dritten Tag nach der Bestrahlung. Es gibt nur wenige Erkrankungen oder unspezifische Reaktionen, die eine Abnahme der Retikulozyten im peripheren Blut verursachen. Deshalb ist der Retikulozytenwert sehr spezifisch für eine Schädigung durch ionisierende Strahlung. Die Messung der Retikulozytenwertes kann schnell in einer größeren Bevölkerungsgruppe mit Hilfe elektronischer Zählgeräte durchgeführt werden und eignet sich deshalb auch in Katastrophensituationen.

Biologische und physikalische Grundlagen

Erythropoese

Die im peripheren Blut vorkommenden Zellen haben ihren Ursprung in den Stammzellen im Knochenmark und im lymphatischen Gewebe. Der Hauptbestandteil (ca. 90 % der Trockenmasse) der roten Blutzellen (Erythrozyten) ist das Hämoglobin. Die Funktion der Erythrozyten ist der Gastransport im Organismus. Die Vorläufer der Erythrozyten sind die Erythroblasten und Normoblasten im Knochenmark. Die Haemoglobinsynthese findet bereits in diesen Zellen statt. Von der Stammzelle bis zum Retikulozyt durchlaufen die Zellen vier Zellteilungen. Danach wird der Zellkern ausgeschleust und die RNA im Zytoplasma abgebaut. Durch Anfärben der RNA lassen sich in den Retikulozyten bestimmte Färbemuster erkennen, aufgrund derer eine Unterscheidung verschiedener Reifungsstufen möglich ist (z.B. Gruppen O-IV nach Heilmeyer). Der Reifungsprozess ist abgeschlossen, wenn die gesamte RNA abgebaut ist. Noch während ihrer Reifung zum Erythrozyt gelangen die Retikulozyten in das periphere Blut. Normoblasten sind normalerweise nur im Knochenmark zu finden und Retikulozyten der Reifungsstufen I und II gelangten ebenfalls nur zu einem sehr geringen Teil ins periphere Blut. Bei einer extrem gesteigerten Erythropoese als Folge eines hohen Blutverlustes oder eines stark vermehrten Erythrozytenabbaus werden diese Zellen zu einem früheren Zeitpunkt ins Blut ausgeschleust, so daß vereinzelt sogar Normoblasten im Blut zu finden sind.

Die reifen Erythrozyten zirkulieren ca. 100-120 Tage im Blut und werden dann von den Zellen des reticuloendothelialen Systems in Leber, Milz und Knochenmark phagozytiert. Unter Normalbedingungen werden innerhalb von 24 Stunden rund 0,8% der 25×10^{12} Erythrozyten eines Erwachsenen erneuert (Schmidt, Thews, 1983). Bei Blutverlust oder pathologisch verkürzter Lebensdauer der Erythrozyten kann die Erythropoeserate auf ein Vielfaches ansteigen.

Der wirksame Reiz für die Erythropoese ist das Absinken des O_2 -Partialdruckes im atmenden Gewebe. Wird der O_2 -Bedarf größer als die O_2 -Zufuhr, kann eine erhöhte Erythropoetin-Konzentration im Blut nachgewiesen werden.

Erythropoetin ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 30000. Es wird durch ein Enzym, dem Proerythropoetin oder renalen Erythropoesefaktor, von einem Plasmaglobulin abgespalten. Proerythropoetin wird vorwiegend von den Nieren, in geringer Konzentration auch von der Leber abgegeben. Erythropoetin stimuliert die Differenzierung und die Proliferationsrate der determinierten erythropoetischen Stammzellen im Knochenmark und steigert außerdem die Hämoglobinsynthese in Erythroblasten.

Etwa 25-40% der Leukozyten sind Lymphozyten. Sie zählen zu den langlebigen Zellen. Ihre Reifungsdauer beträgt ca. 10 Tage. 80% der zirkulierenden Lymphozyten haben eine Lebensdauer zwischen 100 und 150 Tagen, die restlichen 20 % haben nur eine Lebensdauer von wenigen Tagen. Je nachdem, ob ihre Entwicklung vom Thymus oder einem anderen lymphatischen Organ abhängt, unterscheidet man T-Lymphozyten oder B-Lymphozyten. Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle bei der erworbenen (spezifischen) Abwehrfunktion.

Monozyten, die nur einen geringen Anteil (4-8 %) der Leukozyten ausmachen, besitzen die größte Phagozytose-Kapazität aller Blutzellen. Sie wandern vom Blut in das umgebende Gewebe, wo sie sich vergrößern und als Histocyten oder Gewebsmakrophagen sesshaft werden.

Die Normalwerte der Konzentrationen und die Größen der verschiedenen Blutzellen im peripheren Blut bei gesunden Erwachsenen sind in Tab. II.1 zusammengefaßt.

Versuchstiere

Die Tierversuche wurden mit männlichen Kaninchen der Linie Z (Fa. Dr. Zimmermann, Untergröningen/Stuttgart) durchgeführt. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum bei 21° C gehalten. Es wurde ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus mit einer Heil-Phase von 12 Stunden

Tabelle III Konzentrationen und Größen der verschiedenen Zellen im Blut, (aus: H. Thelml, Taschenatlas der Haematologie)

	Zell- durchmesser / μm	Zellkonzentration pro μl	
		Mittelwert	Variation
Rote Blutzellen: Erythrozyten:	~ 10	m: $4.8 * 10^6$ f: $5.4 * 10^6$	$(4.2-5.2) * 10^6$ $(4.5-6.2) * 10^6$
Retikulozyten:	~ 10	m: $86 * 10^3$ f: $115 * 10^3$	$(40-150) * 10^3$ $(40-190) * 10^3$
Weiße Blutzellen: (Leukozyten)		7 000	4 000-10 000
Granulozyten	10-17		
neutrophile		$\sim 3\ 650$	1 850- 7 250
eosinophile		165	0- 400
basophile		~ 50	0- 100
Lymphozyten	6- 9	2 500	1 500- 4 000
Monozyten	12-20	450	70- 840
Thrombozyten:	1- 4 Dicke: 0,5-0,75	$180 * 10^3$	$(110-250) * 10^3$

(7.00-19.00 Uhr) und einer Dunkelphase von 12 Stunden erzeugt. Futter (Altromin Standard Diät für Kaninchen, Altromin Werke, Lage) und Wasser standen den Tieren jederzeit ausreichend zur Verfügung.

Die Tiere wurden 2-3 Wochen vor Versuchsbeginn geliefert. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung waren sie 10-12 Wochen alt und hatten ein Körpergewicht zwischen 3 und 4 kg.

Für die Auswahl der Versuchstiere waren im wesentlichen zwei Gesichtspunkte maßgebend. Im Verhältnis zu den für die Experimente notwendigen Blutentnahmen soll das Gesamtblutvolumen der Tiere möglichst groß sein, da sonst mit einer erheblichen Beeinflussung der normalen physiologischen Funktion, insbesondere einer Stimulierung der Erythropoese zu rechnen ist. Bei einem Gesamtblutvolumen der Kaninchen von ca. 250 ml beträgt der Blutverlust durch die täglichen Entnahmen von jeweils 2-3 ml Blut nur ca. 1 % des gesamten Blutes pro Tag.

Mit der vorgegebenen Bestrahlungsanlage (35 MeV-Betatron) soll zudem bei homogener Dosisverteilung im gesamten Tierkörper eine möglichst hohe Dosisleistung erreicht werden. Es sollten deshalb möglichst kleine Tiere verwendet werden.

Kaninchen sind aus den genannten Gründen als Versuchstiere geeignet. Ihr Blutvolumen ist ausreichend groß, und eine homogene Ganzkörperbestrahlung ist wegen ihrer geringen Körpergröße innerhalb weniger Minuten durchführbar (Dosisleistung ca. 1 Gy/min). Außerdem ist der mittlere Retikulozytenwert beim Kaninchen im Vergleich zum Menschen etwa doppelt so hoch. Die statistischen Fehler der Messungen sind bei den Tierexperimenten entsprechend geringer.

Beschreibung des Durchflußzytometers

Für die folgenden Untersuchungen wurde das Durchflußzytometer Cytofluorograph 30 L der Firma Ortho Instruments benutzt. Es soll hier ein kurzer Überblick über den Aufbau der Anlage gegeben werden. Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit durchgeführten Modifikationen werden dabei ausführlich beschrieben.

Das hydrodynamische System

Das hydrodynamische System (Abb. II.1) besteht aus einem Vorratsgefäß für partikelfreies Wasser, einer Probenkammer, zwei Druckminderern und vier Ventilen (V) zur Steuerung der einzelnen Flüssigkeitsströme sowie einer Durchflußküvette.

Zur Verbesserung der Qualität des Hüllstromwassers und zur Vermeidung von Verunreinigungen der Zuleitungen durch Algenwuchs wurde ein spezieller Vorratsbehälter konstruiert. Der Behälter wird mit gefiltertem Wasser gefüllt, das mit einer Filteranlage (Milli – Q, Fa. Millipore) aufbereitet wurde. Der Inhalt des Vorratsgefäßes wird ständig mit einer Zahnradschleuse durch einen Membranfilter (Porengröße: 0,1 µm, Fa. Pall) umgewälzt. Die Zuleitung zur Durchflußküvette taucht in ein kleines Überlaufgefäß am Ausgang des Filters. Mit einem Druckregler und gefilterter Druckluft wird in dem Behälter ein bestimmter Überdruck eingestellt, so daß das Wasser über die Zuleitung mit konstanter Geschwindigkeit durch die Küvette fließt. Die Strömungsgeschwindigkeit dieses Hüllstromes wird durch den eingestellten Hüllstrom-Druck und einer der Küvette nachgeschalteten Drossel bestimmt. Diese Drossel besteht aus dünnem Teflonschlauch (0,3 mm x 0,7 mm). Bei einer Länge der Drossel von 1 m und einem Druck von $1,5 \times 10^5$ Pa im Vorratsgefäß beträgt die Strömungsgeschwindigkeit in der Küvette ca. 5 m/s.

Die Durchflußküvette (Abb. II.2) besteht aus UV-transparentem Quarzglas. Um optimale optische Eigenschaften zu erzielen, hat sie einen quadratischen Querschnitt mit den Außenmaßen 5 mm X 5 mm und den Innenmaßen des Durchflußkanals 250µm x 250µm. Diese

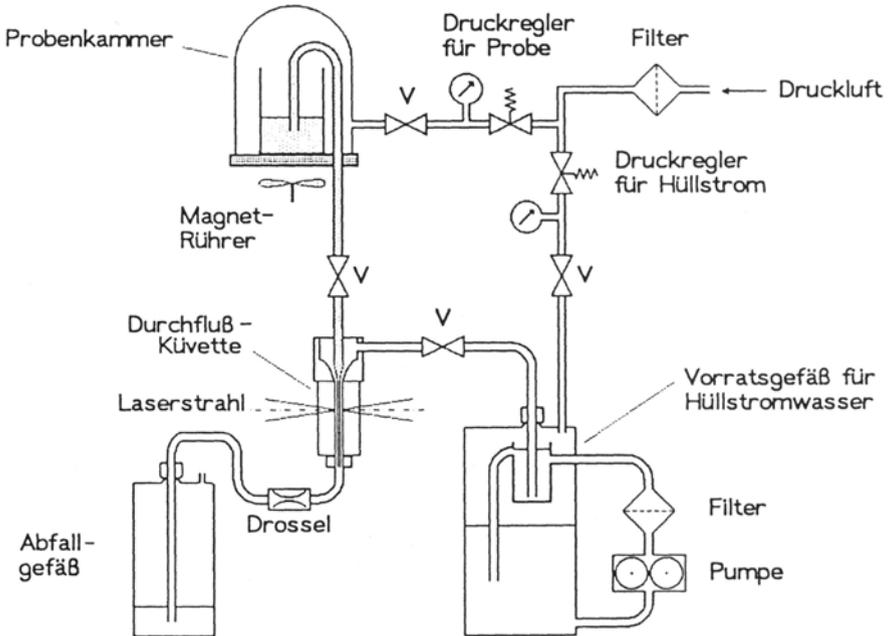


Abb. II.1 Schematische Darstellung des Durchflusssystems.

Partikelfreies Wasser wird mittels Druckluft aus einem Vorratsgefäß durch die Durchflußküvette gedrückt. Durch ständige Zirkulation über ein Filter (Porengröße: $0,1 \mu\text{m}$) wird eine hohe Reinheit des Hüllstromwassers gewährleistet. Die Probe wird ebenfalls mittels Druckluft in die Küvette gedrückt. Probenstrom und Hüllstrom fließen laminar und mit konstanter Geschwindigkeit durch die Küvette, so daß die Zellen einzeln nacheinander den Fokus des Laserstrahls passieren. Die Strömungsgeschwindigkeit in der Küvette wird durch eine austauschbare Drossel bestimmt, die der Küvette nachgeschaltet ist. Die Ventile (V) dienen zur Steuerung der einzelnen Flüssigkeitsströme.

Quarzküvette ist auf einen Sockel mit einer konischen Bohrung geklebt, in dessen Mitte sich eine Düse befindet (Durchmesser der Öffnung: $150 \mu\text{m}$).

Mit einem zweiten Druckregler wird der Druck in der Probenkammer so eingestellt, daß die Probe über eine dünne Zuleitung durch diese Düse gedrückt wird. Durch die konische Verengung des Küvettensockels werden Hüllstrom und Probenstrom beschleunigt und fließen laminar durch die Küvette. Dabei verengt sich der Probenstrom auf bis zu $5 \mu\text{m}$ (hydrodynamische Fokussierung). Die Zellen passieren den Fokus des Laserstrahls einzeln nacheinander. Wie weit der Probenstrom eingengt wird, ist abhängig von der Druckdifferenz zwischen Hüllstrom und Probenstrom. Eine hohe Auflösung bei der Messung erfordert einen minimalen Probenstromdurchmesser.

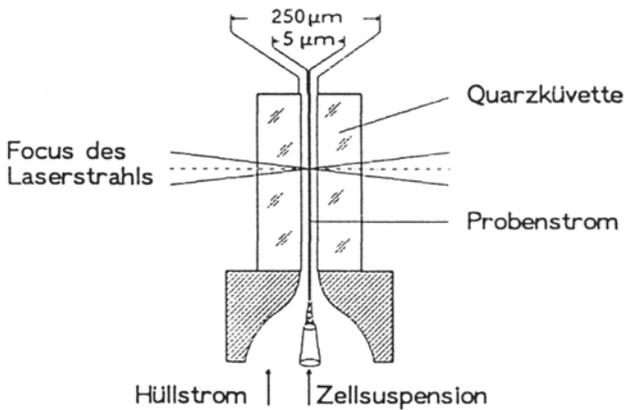


Abb. II.2 Die Durchflußküvette besteht aus UV-transparentem Quarzglas und hat einen quadratischen Querschnitt mit den Außenmaßen 5 mm X 5 mm und den Innenmaßen des Durchflußkanals 250 µm x 250 µm. Diese Quarzküvette ist auf einen Sockel mit einer konischen Bohrung geklebt, in dessen Mitte sich eine Düse (Durchmesser der Öffnung: 150 µm) befindet, durch die gelangt die Probe in die Mitte des Hüllstromes. Durch die Einengung von Probenstrom und Müllstrom werden diese beschleunigt und fließen in einer laminaren Strömung durch die Küvette (hydrodynamische Fokussierung). Dadurch passieren die Zellen den Fokus des Laserstrahls einzeln nacheinander.

Das optische System

Abb. II.3 zeigt eine schematische Darstellung des optischen Systems des Durchflußzytometers. Als Lichtquellen stehen zwei Argon-Ionen-Laser zur Verfügung. Die Strahlen werden mit Hilfe von je zwei justierbaren Umlenkspiegeln durch ein Fokussierungselement in die Durchflußküvette gelenkt. Dieses Fokussierungselement besteht aus zwei gekreuzten Zylinderlinsen ($f_1 = 6,9 \text{ mm}$, $f_2 = 72 \text{ mm}$), deren Achsen senkrecht zueinander stehen. So entsteht ein Strahlenbündel mit elliptischem Querschnitt und den Maßen 150 µm x 5 µm im Fokus. Die Zellen durchlaufen diese Ellipse senkrecht zur langen Achse. Durch dieses Beleuchtungsprinzip wirken sich seitliche Schwankungen des Probenstroms nur geringfügig auf die Anregungsintensität aus.

Das Fluoreszenz- bzw. Streulicht der Zellen wird von zwei Kondensoren – eine in Richtung des Laserstrahls und eine senkrecht zum Strahl – erfaßt und drei Photomultipliern gemessen, die mit diesen Meßplätzen durch Glasfaserlichtleiter verbunden sind.

Zur Messung des Kleinwinkelstreulichtes wird der direkte Strahl durch einen 1,5 mm breiten schwarzen Blechstreifen (Absorber) vor der Kondensorenlinse ausgeblendet. Das unter einem Winkel von 2° - 7° zum Laser-

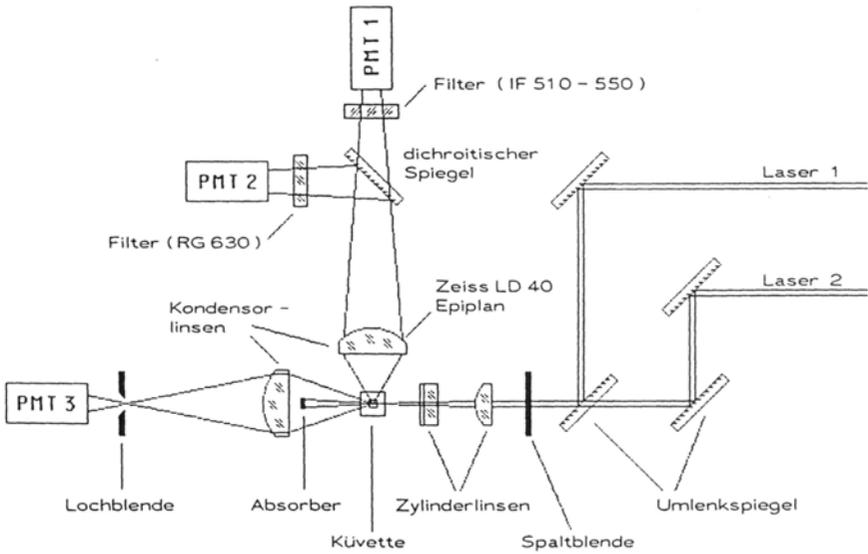


Abb. II.3 Strahlengang des optischen Systems des Durchflußzytometers, wie es für die Messungen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

strahl gestreute Licht wird auf eine Lochblende projiziert und mit einem Glasfaserlichtleiter zu einem Photomultiplier (PMT 3) weitergeleitet.

Senkrecht zum Laserstrahl können Fluoreszenzlicht und 90°-Streulicht gemessen werden (PMT 1 und PMT 2). Durch Auswahl geeigneter dichroitischer Spiegel und Filter im Strahlengang werden die Wellenlängenbereiche für die Fluoreszenz von verschiedenen Farbstoffen festgelegt. Bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden zur Messung der roten AO-Fluoreszenz (PMT 2) ein Kantenfilter (RG 630, Fa. Schott) und zur Messung der grünen TO-Fluoreszenz (PMT 1) ein Interferenzfilter (IF 510-550, Fa. Ortho Diagnostic Systems) verwendet.

Modifikationen des optischen Systems

Um Empfindlichkeit und Auflösung des Durchflußzytometers zu erhöhen und den Anwendungsbereich der Anlage zu erweitern, wurde im März 1985 ein leistungsstarker Argon-Ionen-Laser (Spectra Physics, Mod. 2025-05) installiert. Dieser ist mit einem abstimmbaren Resonator ausgestattet und besitzt im Vergleich zu dem vorhandenen Argon-Ionen-Laser (Mod. 60 C/63, American Laser Corporation) eine wesentlich höhere Ausgangsleistung (1,5 W gegenüber 50 mW für Licht der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$). Mit speziellen Resonator-Spiegeln ist es möglich, den Laser im UV-Bereich einzusetzen (maximale Ausgangslei-

stung: 400 mW im Multi-line-Betrieb: 351,1 nm-363,8 nm), was die Verwendung einer Reihe weiterer Fluoreszenz-Farbstoffe ermöglicht.

Der neue Laser (Laser 2 in Abb. II.3) und die optische Bank des Durchflußzytometers wurden auf einen zu diesem Zweck angefertigten Tisch montiert. Die Strahlage wird mit Hilfe von zwei Justierfassungen (Fa. Spindler und Hoyer) eingestellt. Für Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich werden in diese Fassungen hoch reflektierende Laserspiegel (G 3802-009, Fa. Spectra Physics) eingebaut, die bei Verwendung von Licht im UV-Bereich gegen Aluminium-Oberflächenspiegel (Spindler und Hoyer) ausgetauscht werden müssen.

Bei Verwendung des serienmäßig eingebauten Fokussierungselements darf der Strahldurchmesser 1,2 mm nicht überschreiten, da sonst infolge von Öffnungsfehlern der Zylinderlinse mit dem kleineren Krümmungsradius ($f_1 = 6,3$ mm) Interferenzen in der Brennebene auftreten, die zu Problemen bei der Signalverarbeitung führen. Der Strahldurchmesser des Lasers beträgt ca. 1,8 mm, wenn die Modenblende im Resonator gerade soweit verkleinert wird (Blende 6), daß transversale Moden ausgeschaltet werden (TEM_{00}). Durch weiteres Verkleinern der Modenblende kann der Strahldurchmesser noch etwas eingeengt werden, wodurch aber die maximal erreichbare Ausgangsleistung begrenzt wird.

Abb. II.4a zeigt die Pulsform von grün fluoreszierenden Latexpartikeln (Polybeads, Durchmesser 2,4 μm , Fa. Polyscience) bei einem Strahldurchmesser von 1,8 mm vor dem Fokussierungselement. Bei der Pulsflächen-Analyse, wie sie bei der Messung von Fluoreszenzsignalen bei

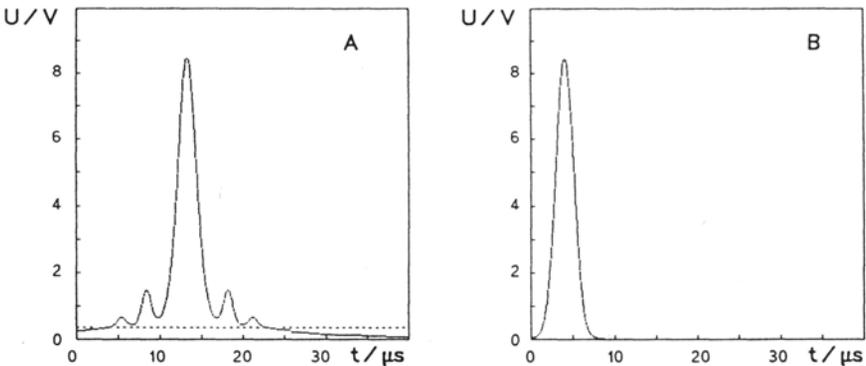


Abb. II.4 Fluoreszenzsignal von Latexpartikeln (Polybeads 2,4 μm)

A: Bei einem Strahldurchmesser von 1,8 mm vor der Fokussierungsoptik kommt es durch Öffnungsfehler zu Interferenzen in der Brennebene der vorderen Zylinderlinse ($f=6,3$ mm) und damit zu Seitenpeaks der Fluoreszenzsignale.

B: Mit Strahlbegrenzung durch eine Spaltblende (Spalt: 1,2 mm) und Verkleinern der Modenblende (Blende Nr. 3 = Strahldurchmesser 1,5 mm) des Lasers.

diesem Durchflußzytometer verwendet wird, liegen in Abhängigkeit von der Signalhöhe mehr oder weniger Nebenmaxima innerhalb der Integrationsgrenzen. Die Pulsfläche ist dann nicht mehr proportional zur Fluoreszenzintensität der Zellen. Außerdem besteht die Gefahr, daß diese Seitenpeaks als Signal einer einzelnen Zelle registriert werden. Eine Begrenzung des Laserstrahls ist daher notwendig.

Der Strahldurchmesser kann mit verschiedenen Methoden verkleinert werden:

1. Verkleinern der Modenblende im Laser. Die maximal erreichbare Ausgangsleistung des Laser wird dadurch jedoch begrenzt.
2. Einengen des Laserstrahls durch ein Fernrohr. Der Durchmesser eines parallelen Strahlenbündels wird beim Durchgang durch zwei Sammellinsen, die im Abstand ihrer Brennweiten voneinander entfernt sind (Kepler-Fernrohr), im Verhältnis der Brennweiten vergrößert bzw. verkleinert. Intensitätsverluste treten hier durch Reflexionen an den Linsenoberflächen auf.
3. Begrenzen des Laserstrahls durch eine Spaltblende. Die Öffnungsfehler werden durch die Zylinderlinse mit dem kleineren Krümmungsradius verursacht, deren Achse senkrecht zum Probenstrom steht. Es genügt deshalb eine Begrenzung des Laserstrahls in diese Richtung durch eine Spaltblende. Die Begrenzung des Strahls führt ebenfalls zu einem Intensitätsverlust.

Um mit dem serienmäßig eingebauten Fokussierungselement eine möglichst hohe Leuchtdichte im Fokus zu erhalten, wurde mit allen drei Methoden experimentiert. Die maximale Leuchtdichte wurde dabei durch Messung der Fluoreszenzintensitäten von grün fluoreszierenden Latexpartikeln (Polybeads, $\varnothing 2,4\mu\text{m}$) ermittelt.

Beim Verkleinern der Modenblende des Lasers erreichten die Fluoreszenzsignale eine maximale Pulshöhe bei Blende 3, was einem Strahldurchmesser von ca. 1,5 mm entsprach. Zusätzlich wurde der Strahl durch eine Spaltblende mit unabhängig voneinander einstellbaren Schneiden begrenzt, die vor das Fokussierungselement montiert wurde. Damit kann der Strahl von oben und von unten gerade soweit begrenzt werden, daß die Nebenmaxima verschwinden und das Hauptmaximum des Fluoreszenzsignals unverändert bleibt (Abb. II.4b). Dabei wurde für Latexpartikel (Polybeads, $0,2,4\mu\text{m}$, Standardabweichung: 0,05 %) ein Variationskoeffizient von $CV = 0,007$ gemessen.

Durch Linsen mit den Brennweiten $f_1 = 40\text{ mm}$ und $f_2 = 80$ wurde der Laserstrahl auf die Hälfte seines Durchmessers komprimiert. Bei der für TEM₀₀ größtmöglichen Modenblende (Blende 6) ergibt sich so ein

Strahldurchmesser von 0,9 mm. Mit dieser Anordnung läßt sich bei gleicher Auflösung eine etwa um den Faktor 1,2 höhere Leuchtdichte im Fokus erreichen.

Da sich die Richtung des Laserstrahls bei verschiedenen Betriebsbedingungen (z. B. Änderung der Wellenlänge) immer etwas ändert, soll die Justierung schnell und einfach korrigiert werden können. Aus diesem Grund wurde die Strahlbegrenzung mit der Spaltblende bevorzugt.

Bei diesen Messungen zeigte sich, daß Luftzirkulationen im Strahlengang (Kühlgebläse der Elektronik) thermische Prismen erzeugen können, die zu Intensitätsschwankungen am Meßort führen. Der freie Strahl zwischen Laserkopf und Fokussierungslinsen wurde deshalb verkleidet.

Durch den Einbau des neuen Argon-Ionen-Lasers können erheblich höhere Leuchtdichten im Fokus erreicht werden. Außerdem liegt der Rauschanteil erheblich unter dem des alten Lasers. Messungen an den Strahlen beider Laser ergaben für den Laser der Fa. American Laser Corp. einen Rauschanteil von 0,025 bei einer Ausgangsleistung von 35 mW und für den Laser der Fa. Spectra Physics einen Rauschanteil von 0,005 bei einer Ausgangsleistung von 1W. Dabei wurden beide Laser im „Power-Mode“, d.h. elektronisch konstant gehaltener Ausgangsleistung betrieben.

Um die Empfindlichkeit des Durchflußzytometers für die Fluoreszenz-Messungen zu erhöhen, wurde in den Strahlengang senkrecht zum Laserstrahl eine Kondensorlinse mit einer höheren numerischen Apertur eingebaut. Dazu wurde ein Mikroskop Objektiv (Zeiss LD 40/Epiphan) mit einer numerischen Apertur von $A = 0,6$ verwendet. Die numerische Apertur der serienmäßig eingebauten Linse ist $A = 0,15$. Mit dem Mikroskop-Objektiv wird deshalb ein größerer Anteil des Fluoreszenzlichtes erfaßt. Die Empfindlichkeit konnte so etwa um das 4,5fache erhöht werden.

Signalverarbeitung

Abb. II.5 zeigt ein Blockschaltbild der Elektronik zur Signalverarbeitung. Die Signale der drei Photomultiplier (PMT 1-3) werden zunächst von drei Vorverstärkern verstärkt und dann von dem im Durchflußzytometer eingebauten Signalprozessor (FC 300) weiterverarbeitet. Durch zwei identische Kanäle (Kanal X und Y) im Signalprozessor können die Signale von jeweils zwei Photomultipliern gleichzeitig verarbeitet werden. Die anliegenden Signale werden mit dem Eingangsschalter (S) auf den jeweiligen Kanal geschaltet. Es wird entweder die Pulshöhe (PHA), die Pulsfläche (PAA) oder die Pulsbreite (PWA) der Signale analysiert

und ein Rechteckimpuls weitergeleitet, dessen Amplitude proportional zur gemessenen Größe ist. Diese Rechteckimpulse werden von einem Verstärker mit entweder linearer oder logarithmischer Kennlinie weiterverarbeitet. Gleichzeitig liefert der Signalprozessor ein Triggersignal. Die Triggerschwelle kann dabei für die Signale X und Y getrennt eingestellt werden.

Die Signale dürfen eine Anstiegszeit von $3/\mu\text{s}$ nicht unterschreiten, da sonst Fehler in der Signalverarbeitung auftreten (Linearität des Pulsflächenanalysators). Die Anstiegszeit kann durch Verändern der Durchflußgeschwindigkeit mit der Drossel optimiert werden.

Die Impulse vom Signalprozessor werden von zwei Analog-Digital-Wandlern (ADC) umgewandelt und auf einen Personal-Computer (Toshiba T 300) übertragen. Mit Hilfe von verschiedenen Programmen (Krämer, 1989) können die Daten dargestellt, ausgewertet und auf Datenträger gespeichert werden. Für einparametrische Histogramme ist die Auflösung 1024 Kanäle und für zweiparametrische Histogramme wahlweise 256×256 Kanäle bzw. 128×128 Kanäle. Ein Teil der Tierexperimente wurde noch mit einem anderen Personal-Computer (Tandy TRS-80) durchgeführt. Mit diesem Computer konnte nur eine Auflösung von 256 Kanäle für einparametrische Histogramme und 64×64 Kanäle für zweiparametrische Histogramme erreicht werden.

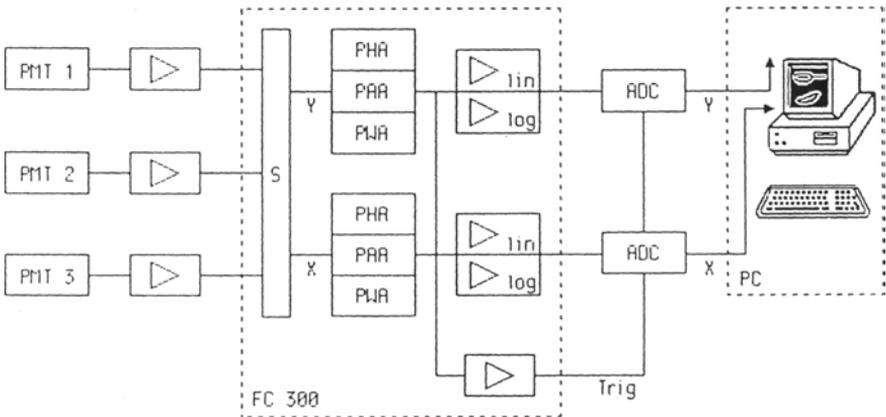


Abb. II.5 Vereinfachtes Blockschaltbild zur Signal Verarbeitung im Durchflußzytometer.

Modifikationen des Signalprozessors

Mit dem Austausch des eingebauten Netzteils durch ein externes Netzteil und durch zusätzliche Masseverbindung der Hauptplatine des Signalprozessors mit den übrigen Komponenten der gesamten Anlage konnte das Netzbrummen am Eingang des Signalprozessors von 200 mV auf 15 mV reduziert werden.

Die Log-Verstärker wurden gegen zwei neue Log-Verstärker (FC 300 Analog/Logging PCB 300-1651-000, Fa. Ortho Diagnostic Systems) mit einem erweiterten Meßbereich ausgetauscht. Die Kennlinien der alten sowie der neuen Log-Verstärker sind in Abb. IL 6 dargestellt. In den Vorverstärker eines Photomultiplieres wurden Rechteck-Impulse mit der Amplitude U_1 und einer Dauer von $4 \mu\text{s}$ eingespeist und die Amplitude U_2 der Signale am Ausgang des Signal-Prozessors (im PHA-Modus) gemessen. Mit dem neuen Log-Verstärker kann ein Meßbereich von etwa 2 Dekaden ($U_1 = 15 \text{ mV} - 2000 \text{ mV}$) genutzt werden. Unterhalb von 15 mV verläuft die Kennlinie nicht mehr exponentiell und die Signale gehen im Netzbrummen (15 mV) unter. Der Meßbereich des alten Log-Verstärkers reichte etwa über eine Dekade ($U_1 = 40 \text{ mV} - 400 \text{ mV}$). Bei diesem Verstärker treten oberhalb von 400 mV Abweichungen von der exponentiellen Kennlinie auf.

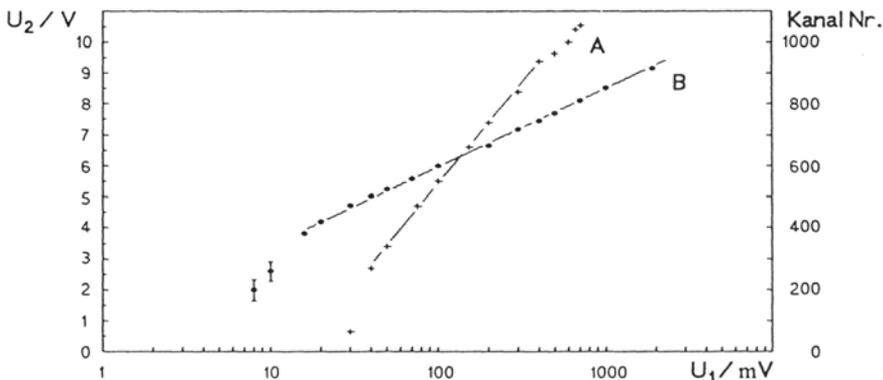


Abb. 11.6 Kennlinien des Signalprozessors mit altem (A) und neuem Log-Verstärker (B). In den Vorverstärker eines Photomultiplieres wurden Rechteck-Impulse mit der Amplitude U_1 und einer Dauer von $4 \mu\text{s}$ eingespeist und die Amplitude U_2 der Signale am Ausgang des Signal-Prozessors (im PHA-Modus) gemessen.

Bestrahlungsanlage und Dosimetrie

Die Kaninchen wurden am Betatron (Fa. Siemens, Maximalenergie 35 MeV) mit Elektronen einer Energie von 25 MeV und einer Dosislei-

stung von ca. 1 Gy/min bestrahlt. Während der Bestrahlung saßen die Tiere in einem quaderförmigen Käfig aus gelochten Plexiglas-Platten mit einer Wandstärke von 8 mm. Die Innenmaße des Käfigs waren 380 mm X 80 mm X 160 mm. Die Länge des Käfigs konnte durch eine verschiebbare Platte so begrenzt werden, daß das Versuchstier den Käfig fast vollständig ausfüllte. Um ein möglichst großes Bestrahlungsfeld zu erhalten, wurde der Tubus am Betatron hochgeklappt und eine Streufolie vor das Austrittsfenster montiert. Diese Streufolie bestand aus einem 2 mm starken Aluminium-Blech, das in der Mitte mit einem zusätzlichen 23 mm breiten Aluminiumstreifen auf eine Dicke von 4 mm verstärkt war. Die Vorderseite des Plexiglas-Käfigs wurde in einem Abstand von 1,6 m von dieser Streufolie senkrecht zur Strahlachse ausgerichtet. In diesem Abstand wurde ein nahezu homogenes Strahlungsfeld über den gesamten Tierkörper erreicht. Die Abnahme der Dosis quer zur Strahlachse bis zum Rand des Plexiglas-Käfigs war geringer als 10% (Werner, 1972).

Da das Kaninchen den Käfig fast vollständig ausfüllt, entspricht der Dosisverlauf im Versuchstier annähernd dem Dosisverlauf in einem mit Wasser gefüllten Kasten. Nach der Tiefendosiskurve für Elektronen mit einer Energie von 25 MeV in Wasser nimmt die Dosis bis zur Rückseite des Käfigs ($d = 80$ mm) um ca. 10 % ab. Die Tiere wurden deshalb von beiden Seiten mit jeweils der Hälfte der Gesamtdosis bestrahlt.

Die Dosis und die Dosisleistung wurden mit einer auf der Vorderseite des Käfigs fixierten Ionisationskammer (Ionisationskammer Typ M 233641, $V = 0,3$ cm³, Dosimentor DI4, DL4 und EK4, Physikalisch-Technische Werkstätten, Freiburg) gemessen.

Bei den Teilkörperbestrahlungen wurde jeweils die vordere bzw. die hintere Körperhälfte der Kaninchen mit 50 mm starken Bleiziegeln abgeschirmt.

Bestimmung des Retikulozytenwertes

Definition des Retikulozytenwertes

Der Retikulozytenwert R im peripheren Blut ist definiert als der Quotient aus der Anzahl der Retikulozyten und der Summe von Erythrozyten und Retikulozyten: $R = N_R / (N_R + N_E)$, wobei N_R die Anzahl der gemessenen Retikulozyten und N_E die Anzahl der gemessenen Erythrozyten pro Volumen ist.

Mikroskopische Bestimmung des Retikulozytenwertes

Retikulozyten im peripheren Blut enthalten noch Reste von RNA in Mitochondrien und Ribosomen, die im Laufe ihrer Reifung abgebaut werden. Reife Erythrozyten besitzen schließlich keine RNA mehr. In der klinischen Praxis werden die Retikulozyten nach Anfärbung der RNA mit dem Farbstoff Brillantkresylblau unter dem Mikroskop gezählt. Dabei werden im allgemeinen 1000 rote Blutzellen ausgewertet. Bei einem Retikulozytenwert von $10 - 20 \times 10^{-3}$, der etwa dem Normalbereich beim Menschen entspricht, werden also nur 10-20 Retikulozyten pro 1000 Zellen gezählt. Die statistische Sicherheit ist deshalb sehr gering (relativer Fehler: $\sim 0,30$). Sollen in der gleichen Blutprobe etwa 100 Retikulozyten erfaßt werden (relativer Fehler: $\sim 0,10$), ist mit einer Auswertungszeit von über einer Stunde zu rechnen. Bei Blutproben mit niedrigeren Werten muß mit entsprechend längeren Auswertungszeiten gerechnet werden.

Eine zusätzliche Fehlerquelle ist die gelegentlich subjektive Unterscheidung zwischen Erythrozyten und Retikulozyten. Wenn die gleiche Blutprobe von mehreren Personen mit dem Mikroskop mehrfach ausgewertet wird, zeigen die Meßergebnisse oft eine größere Streuung als für eine Zufallsverteilung zu erwarten ist (Gilmer und Koepke, 1967, Londeree and Allaire, 1969, Peebles et al., 1981, Furlong, 1973, Savage et al., 1985). Bei den gebräuchlichen Färbemethoden ist die Unterscheidung der Zellen oft noch durch Farbstoffpartikel auf dem Blutausrich erschwert.

Diese Auszählung mit dem Mikroskop ist deshalb nicht geeignet, um die Retikulozytenwerte bei einer großen Zahl von Personen schnell und präzise messen zu können.

Durchflußzytometrische Methoden zur Bestimmung des Retikulozytenwertes

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von durchflußzytometrischen Techniken entwickelt, die eine schnelle und genaue Bestimmung des Retikulozytenwertes ermöglichen. Mit dem Durchflußzytometer können mehr als 1000 Zellen pro Sekunde gemessen werden. Damit ist es möglich, selbst Proben, in denen nur wenige Retikulozyten enthalten sind, mit einem geringen statistischen Fehler zu messen. Außerdem sind diese automatischen Methoden nicht von einer subjektiven Unterscheidung der Zellen abhängig.

Bei diesen Techniken wird die restliche RNA (Retikulozyten, Thrombozyten) und die DNA (Zellkerne der Leukozyten) in den verschiede-

nen Blutzellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Durch gleichzeitige Messung von Fluoreszenz und Zellgröße (mittels Kleinwinkelstreuung oder Zellvolumen nach dem Coulter-Meßprinzip) lassen sich Erythrozyten, Retikulozyten, Thrombozyten und Leukozyten unterscheiden und ihre relativen Anteile in einer Blutprobe schnell und genau bestimmen.

Ursprünglich sollte durch die Färbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange (AO) die Unterscheidbarkeit von Retikulozyten und Erythrozyten mit dem Mikroskop verbessert werden (Kosenow und May, 1952, Kosenow 1956). Die Ergebnisse dieser neuen Färbetechnik zeigten eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Färbung mit Brillantkresylblau (Vander et al., 1963, Thayer und Becker, 1975).

Eder und Mitarbeiter entwickelten ein Verfahren, das den Ausstrich eines definierten Blutvolumens auf eine Membran ermöglichte (Eder et al., 1969, Eder et al., 1971). Mit einer speziellen Apparatur wurden die Blutzellen auf eine Trägerfolie (Tonband) ausgestrichen und gleichzeitig mit AO angefärbt. Durch automatisches Abfahren der Zellspur und gleichzeitigem Registrieren der Fluoreszenzimpulse unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte die Zahl der Retikulozyten auf dem Band gemessen werden. Damit stand erstmals ein impulspotometrisches Verfahren zur automatischen Bestimmung des Retikulozytenwertes zur Verfügung. Zusätzlich konnten die Blutzellen auf dem Band zur Überprüfung der Ergebnisse am gleichen Präparat auch manuell ausgezählt werden.

Einige Jahre später wurde von Clarke eine Technik entwickelt, die es ermöglichte, mit AO gefärbte Blutzellen in einem kommerziellen Durchflußzytometer zu messen und mit Hilfe von Computerprogrammen die Anteile von Erythrozyten und Retikulozyten zu berechnen (Clarke, 1982).

Ähnliche Techniken wurden von Tanke et al. mit Hilfe des RNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes Pyronin Y entwickelt (Tanke et al., 1980, Tanke et al., 1983). Sage et al. verwendeten zur Anfärbung der RNA in den Retikulozyten den Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T (Sage et al., 1983). Beide Autoren konnten zeigen, daß mit ihren jeweiligen durchflußzytometrischen Techniken eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer mikroskopischen Auswertung erzielt wurde. Mit diesen Methoden konnte gezeigt werden, daß der Reifegrad bzw. der RNA-Gehalt der Retikulozyten eng mit ihrer Fluoreszenzintensität korreliert ist.

Ein weiteres durchflußzytometrisches Verfahren ist die Bestimmung des Retikulozytenwertes mit einer Immunofluoreszenz-Technik. (Seligman

et al., 1983). Bei dieser Doppelantikörpermethode werden die Transferrinrezeptoren auf der Zellmembran der Retikulozyten mit einem Antitransferrinrezeptor-Antikörper (ATR-Antikörper) markiert. Die Zahl der immunologisch aktiven Rezeptoren nimmt während der Reifung der Retikulozyten und mit gleichzeitig abnehmender Haemoglobinsynthese ab. Diese Technik erfordert eine wesentlich aufwendigere Präparation der Zellen als die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen. Es können nur unreife Retikulozyten mit einer relativ hohen Dichte der Transferrinrezeptoren erkannt und von reifen Erythrozyten unterschieden werden. Mit dieser Technik werden daher nur sehr junge Retikulozyten erfaßt. Durch die Anwendung der ATR-Methode parallel zu einer Methode, bei der die RNA der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt wird, kann der Anteil junger Retikulozyten zur Gesamtzahl der Retikulozyten bestimmt werden. Damit können Informationen über Veränderungen der Reifeverteilung der Retikulozyten gewonnen werden. Andere Zelltypen wie Thrombozyten oder Leukozyten können mit dieser Technik nicht erkannt werden.

Methoden zur gleichzeitigen Bestimmung der relativen Anteile von Erythrozyten, Retikulozyten, Thrombozyten, Lymphozyten und Granulozyten wurden 1984 von Valet und Jacobberger vorgestellt (Valet, 1984, Jacobberger et al., 1984). Bei diesen Techniken werden die Blutzellen gleichzeitig mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Zusätzlich zur Anfärbung der DNA/RNA mit AO wird die Zellmembran mit 3,3-dihexyloxacarbocyanine (DiOC 6) angefärbt. Dabei ist die rote bzw. grüne Fluoreszenz von DiOC 6 vom Membranpotential der Zelle abhängig. Mit einer Dreiparameter-Messung von Zellvolumen (Coulter-Volumen) bzw. Streulichtmessung sowie grüner und roter Fluoreszenz können die genannten Zelltypen unterschieden werden. Durch Automatisierung der Präparation und Computerauswertung soll eine Bestimmung der relativen Anteile in etwa 5 Minuten erreicht werden.

Die AO-Technik wurde im Institut für Biophysik der Universität Frankfurt von Schmitz optimiert (Schmitz und Werner, 1986, Schmitz et al., 1985). Bei den in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen wurden die Retikulozytenwerte bei den meisten Tierexperimenten mit dieser Methode gemessen. Sie wird im folgenden ausführlich beschrieben.

Die Untersuchungen mit menschlichem Blut wurden mit dem neuen speziell zur Messung von Retikulozyten entwickelten Farbstoff Thiazolorange durchgeführt (Lee et al., 1986 Van Howe et al., 1989, Van Howe, 1989). Diese Methode und ihre Vorteile gegenüber der AO-Färbung werden ebenfalls in diesem Kapitel beschrieben und diskutiert.

Bestimmung des Retikulozytenwertes mit dem Mikroskop

Retikulozyten im peripheren Blut enthalten noch RNA, die durch Supravitalfärbung mit Brillantkresylblau angefärbt werden kann. In den gefärbten Retikulozyten lassen sich körnige oder netzartige Strukturen erkennen. Im Laufe der Reifung zum Erythrozyt wird die RNA abgebaut. Je jünger der Retikulozyt ist, desto mehr RNA enthält er und desto dichter sind diese gefärbten Strukturen. Aufgrund des Färbemusters können verschiedene Reifungsstufen (Klassifizierung in die Gruppen 0-IV nach Heilmeyer) der Retikulozyten unterschieden werden. Von den Retikulozyten im peripheren Blut gehören etwa 69-75 der Gruppe IV, etwa 19% der Gruppe III und nur zwischen 6-12% den Gruppen I und II an (Heilmeyer und Oortgiese, 1934). Die Retikulozyten der Gruppe 0 besitzen noch Kerne und sind normalerweise nur im Knochenmark zu finden.

Als Probenmaterial eignet sich sowohl Venenblut als auch Kapillarblut. Für die Zählung mit dem Mikroskop wurden 5 μl Blut mit 100 μl Brillantkresylblau-Farblösung (10 mg/l, Sarstedt, Best. Nr. 42117) vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min werden Blutausrichungen hergestellt und mit dem Mikroskop ausgezählt. Bei ca. 900facher Vergrößerung (Ölimmersion) wird die Zahl der Erythrozyten und Retikulozyten in jeweils benachbarten Gesichtsfeldern bestimmt.

Bei Routinebestimmungen in der Klinik werden insgesamt ca. 1000 Zellen ausgewertet. Dabei kann nur eine geringe Zahl Retikulozyten erfaßt werden. Der statistische Fehler ist deshalb sehr groß und von der Retikulozytenzahl selbst abhängig. Streubereiche für die Reproduzierbarkeit der mikroskopischen Auswertung bei verschiedenen Retikulozytenzahlen sind in Tab. II.2 angegeben.

Tabelle II.2 Streubereiche des Retikulozytenwertes R bei Mehrfachbestimmung mit dem Mikroskop in Abhängigkeit von der Anzahl gezählter Retikulozyten für 95 % der Werte, (nach Cartwright, 1968).

Retikulozytenzahl	Streubereich von R für $P_1 = 0,05$
10	4– 16 $\times 10^{-3}$
20	11– 29 $\times 10^{-3}$
40	28– 52 $\times 10^{-3}$
80	63– 97 $\times 10^{-3}$
120	99–141 $\times 10^{-3}$
200	175–225 $\times 10^{-3}$
400	369–431 $\times 10^{-3}$

Der statistische Fehler nimmt ab, wenn mehr Retikulozyten gezählt werden. Blutproben mit einem höheren Retikulozytenwert können deshalb mit einer besseren Reproduzierbarkeit ausgezählt werden. Der relative Fehler nimmt in Tabelle II.2 von 0,60 bei 10 gezählten Retikulozyten auf 0,08 bei 400 gezählten Retikulozyten ab. Der Normalbereich liegt beim Menschen zwischen $10\text{-}25 \times 10^3$. In diesem Bereich müßten für eine genaue Messung (relativer Fehler $\sim 0,10$) etwa 20×10^3 Zellen ausgezählt werden. Dies würde eine Auswertungszeit von mehreren Stunden bedeuten.

Bei einem Strahlenunfall ist unter Umständen mit einer großen Zahl von Patienten zu rechnen, die eine unbekannte Dosis erhalten haben. Da zudem in den ersten Tagen nach einer Bestrahlung der Retikulozytenwert im Blut durch eine Schädigung des Knochenmarks abnimmt, muß zur Ermittlung des Retikulozytenwertes mit dem Mikroskop für eine Dosisabschätzung mit einem erheblichen Aufwand gerechnet werden. Eine Auszählung der Retikulozyten mit dem Mikroskop ist daher praktisch nicht mehr durchführbar; besonders dann nicht, wenn Retikulozytenwerte bei einer größeren Gruppe von Personen gemessen werden sollen.

Für eine Methode zur biologischen Dosimetrie ist die Bestimmung des Retikulozytenwertes mit dem Mikroskop deshalb nicht geeignet. Neue automatische Meßverfahren, mit denen eine schnelle und genauere Bestimmung des Retikulozytenwertes durchgeführt werden können, sind Voraussetzung für ein mögliches Verfahren zur Abschätzung einer unbekanntem Strahlendosis bei verunglückten Personen.

Durchflußzytometrische Messung des Retikulozytenwertes in peripheren Blut des Kaninchens

Farbstoff

Der Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange (AO) färbt sowohl doppelsträngige als auch einzelsträngige Nukleinsäuren. AO bindet an doppelsträngige Nukleinsäuren durch Interkalierung und wegen seiner kationischen Eigenschaft auch an die negativ geladenen Phosphate von einzelsträngigen Nukleinsäuren (Riggler, 1966, Peacocke, 1973, Darzynkiewicz et al., 1975a, Darzynkiewicz et al., 1975b, Darzynkiewicz, 1979).

Acridinorange zeigt bei steigender Konzentration einen Farbwechsel von grüner zu roter Fluoreszenz. Ursache für diese metachromatische Eigenschaft von Acridinfarbstoffen ist die konzentrationsabhängige Wechselwirkung der Farbstoffmoleküle untereinander (Farbstoffaggregate, Polymere). Sowohl Absorptions- als auch Emissionsspektren der

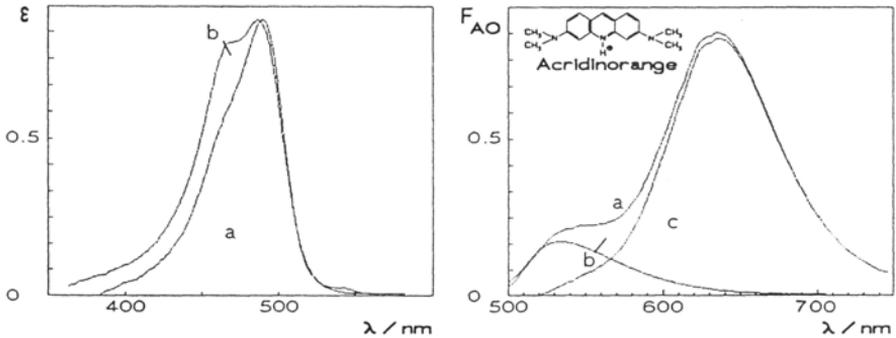


Abb. 11.7 Links: Absorptionsspektrum von AO-Farblösungen mit $c_{AO} = 50 \mu\text{mol/l}$ (Kurve a) und $c_{AO} = 0,5 \text{ mmol/l}$ (Kurve b). Das Absorptionsmaximum der monomeren Farbstoffmoleküle liegt bei einer Wellenlänge von $\lambda = 490 \text{ nm}$. Mit steigender Konzentration bilden sich zunehmend Farbstoffaggregate, deren Absorptionsmaxima bei kürzeren Wellenlängen liegen. Das Absorptionsmaximum der AO-Diniere ($\lambda = 470 \text{ nm}$) tritt bei höherer Konzentration deutlich hervor (Kurve b). Die Kurven sind auf das Absorptionsmaximum normiert (Extinktionskoeffizient in willkürlichen Einheiten).

Zur Anregung der AO-Fluoreszenz kann die blaue Linie eines Argon-Ionen-Lasers bei der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$ verwendet werden.

Rechts: Emissionsspektren von RNA-AO-Komplexen bei Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 460 \text{ nm}$ (Fluoreszenzintensität F_{AO} in willkürlichen Einheiten).

Nach Zugabe von RNA (CRNA = $30 \mu\text{mol/l}$) in eine AO-Farblösung bilden sich unlösliche RNA-AO-Komplexe, die durch Zentrifugation vom Überstand getrennt werden können. Kurve a zeigt das Emissionsspektrum dieser RNA-AO-Komplexe und Resten des Überstands. Der Überstand fluoresziert grün (Emissionsmaximum bei $\lambda = 530 \text{ nm}$). Da die AO-Moleküle hier vorwiegend in monomerer Form vorliegen. Durch Subtraktion des Emissionsspektrums des Überstands (Kurve b) von Kurve a kann das Emissionsspektrum der RNA-AO-Komplexe berechnet werden, (nach: Kapuscinski et al. 1982).

monomeren Farbstoffmoleküle unterscheiden sich von denen der Farbstoffaggregate. Monomere Acridinorange-Moleküle zeigen ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 490 \text{ nm}$ und grüne Fluoreszenz mit einem Maximum bei $\lambda = 530 \text{ nm}$. Durch Aggregation der Farbstoffmoleküle verschiebt sich das Emissionsspektrum zu längeren Wellenlängen ($\lambda = 640 \text{ nm}$) hin. Die Absorptionsmaxima der Farbstoffaggregate liegen bei etwas kürzeren Wellenlängen (Abb. II.7).

Die durch Interkalierung gebundenen Farbstoffmoleküle (starke Bindung) fluoreszieren grün mit dem Emissionsmaximum der einzelnen Farbstoffmoleküle bei $\lambda = 530 \text{ nm}$. Bei der elektrostatischen Bindung an einzelsträngige Nukleinsäuren (schwache Bindung) bilden die Farbstoffmoleküle Aggregate, die eine rote Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei $\lambda = 640 \text{ nm}$ zeigen.

Ein großer Teil der RNA in den Retikulozyten liegt in doppelsträngiger Form vor. Diese doppelsträngige RNA wird jedoch bei AO-Konzentra-

tionen, wie sie zur Färbung benutzt werden, vom Farbstoff selbst denaturiert (Darzynkiewicz et al., 1975a). Die Strukturen in den mit AO gefärbten Retikulozyten fluoreszieren deshalb rot.

Weißer Blutzellen enthalten noch Zellkerne. AO bindet an die darin enthaltene DNA durch Interkalierung. Die Zellkerne der mit AO gefärbten weißen Blutzellen fluoreszieren deshalb grün, während ihr Zytoplasma rot fluoresziert.

Wegen seiner kationischen Eigenschaft bindet AO nicht nur an Nucleinsäuren sondern auch an andere Zellbestandteile wie Proteine und Polysaccharide. Es ist deshalb mit einem unspezifischen Untergrund bei der roten AO-Fluoreszenz zu rechnen.

Färbung

Den Kaninchen wird 1 ml Blut aus der Ohrvene entnommen und zur Vermeidung der Blutgerinnung mit 20 μ l Liqueimin (5000 Units Napheparinat/ml; Hoffmann La Roche) vermischt. 50 μ l Blut werden mit 5 ml Farblösung (0,15 mol/l NaCl, 0,5/xg/ml Acridinorange; Serva) verdünnt und 1 h bei 20° C inkubiert.

Messung

Mit dem Durchflußzytometer (Ortho Diagnostic Systems, Cytofluorograph 30 H) wurden die Signalhöhen der roten Fluoreszenz (> 630 nm) und die Kleinwinkelstreuung der verschiedenen Blutzellen gemessen.

Als Lichtquelle diente ein Argon-Ionen Laser (Spectra Physics, Mod. 2025) bei einer Ausgangsleistung von 1000 mW und einer Wellenlänge von 488 nm. Zur Messung der roten AO-Fluoreszenz wurde ein Kantenfilter (RG 630, Fa. Schott) verwendet. Das Kleinwinkelstreulicht wurde in einem Winkel von 1°-5° zur Achse des Laserstrahl gemessen.

Die Signale beider Parameter wurden mit logarithmischen Verstärkern verstärkt und mit einem TRS-80 Mikrocomputer (Tandy Corp., Forth Worth, TX, USA) als Zweiparameter-Histogramme mit 64 x 64 Kanälen dargestellt, abgespeichert und ausgewertet.

Mit zunehmender Menge des gebundenen Farbstoffs bzw. RNA-Gehalts der Retikulozyten nimmt die Pulshöhe ihrer Fluoreszenzsignale zu. Die Pulshöhe ist jedoch nicht exakt proportional zum RNA-Gehalt der Zellen. Der Fokus des Laserstrahls ist bei der verwendeten optischen Anordnung kleiner als der Durchmesser der Zellen. Die Fluoreszenzintensität der ganzen Zelle könnte daher nur durch Integration der Signale gemessen werden. Integration und anschließende logarithmische Verstärkung der Signale war aber aus technischen Gründen nicht

möglich. Die Fluoreszenz-Intensität der Signale reicht über einen Bereich von mehr als zwei Größenordnungen. Die niedrigen Fluoreszenz-Signale (Autofluoreszenz der Erythrozyten) gehen daher ins Grundrauschen der Meßelektronik über. Durch Triggerung mit den Signalen der Kleinwinkelstreuung als zweitem Parameter kann dennoch die Zahl der Erythrozyten genau registriert werden. Ihre Fluoreszenzverteilung ist jedoch zum Teil vom Grundrauschen überlagert. Eine Integration der Fluoreszenzsignale würde den nutzbaren Meßbereich noch weiter einschränken.

Außerdem ist die Anfärbung der Retikulozyten nicht homogen, so daß die gemessene Fluoreszenzintensität durch unterschiedliche Orientierung der Zellen im Fokus und durch Selbstabsorption der Fluoreszenz ohnehin nicht genau proportional zum RNA-Gehalt der Zellen ist.

Der Zusammenhang zwischen der Pulshöhe der Fluoreszenzsignale und dem Reifungsstadium bzw. RNA-Gehalt der gemessenen Retikulozyten wird später noch genauer untersucht.

Die Signalhöhe des Kleinwinkelstreulichtes ist ein Maß für die Größe der Zellen und bei dem verwendeten Durchflußzytometer proportional zum Durchmesser der Zellen (Egner, 1982).

Abb. II.8a zeigt ein Zweiparameter-Histogramm von gefärbtem Kaninchenblut. Es können drei verschiedene Typen von Blutzellen unterschied-

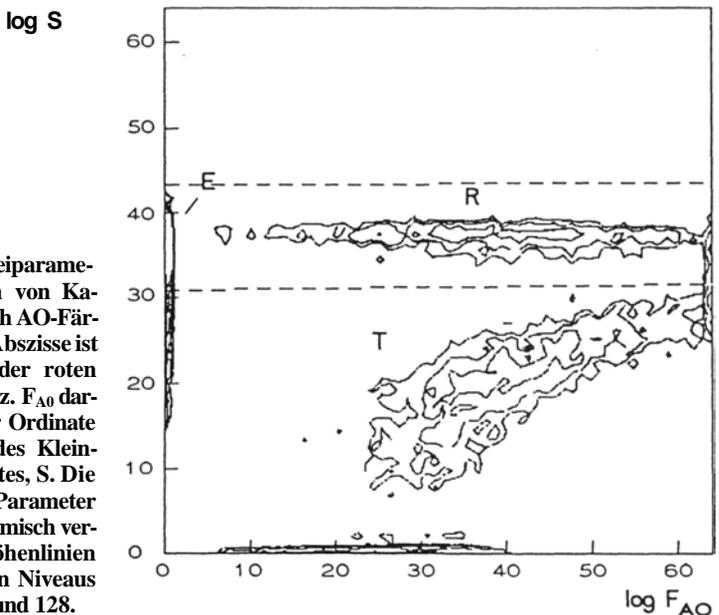


Abb.II.8a Zweiparameter-Histogramm von Kaninchenblut nach AO-Färbung. Auf der Abszisse ist die Intensität der roten AO-Fluoreszenz, F_{AO} dargestellt, auf der Ordinate die Intensität des Kleinwinkelstreulichtes, S . Die Signale beider Parameter wurden logarithmisch verstärkt. Die Höhenlinien entsprechen den Niveaus 4, 8, 18, 32, 64 und 128.

den werden: Erythrozyten (E), Retikulozyten (R) und Thrombozyten (T). Erythrozyten und Retikulozyten haben etwa die gleiche Größe und liefern deshalb auch gleiche Signalhöhen für die Kleinwinkelstreuung. Sie unterscheiden sich aber wesentlich in der Höhe ihrer Fluoreszenzsignale. Die ungefärbten Erythrozyten liegen ganz links in den Kanälen 0-4, während die gefärbten Retikulozyten weiter rechts in den Kanälen 5-63 eine breite Fluoreszenzverteilung zeigen. Die Thrombozyten enthalten ebenfalls RNA und werden deshalb auch angefärbt. Ihre Fluoreszenzintensität liegt im gleichen Bereich wie die der Retikulozyten. Da die Thrombozyten aber wesentlich kleiner sind als Erythrozyten und Retikulozyten, werden sie bei entsprechend kleineren Signalhöhen des Kleinwinkelstreulichtes registriert.

Durch Setzen einer oberen und unteren Grenze für die Signale des Kleinwinkelstreulichtes und Projektion des Histogramms aus diesem „Fenster“ auf die Fluoreszenzachse kann die Fluoreszenzverteilung der Erythrozyten und der Retikulozyten dargestellt werden (Abb. II.8b).

Zur Messung des Retikulozytenwertes R wurde in einem Histogramm, wie es in Abb. II.8b dargestellt ist, die Anzahl der gemessenen Erythrozyten N_E durch Summierung der Kanalinhalt zwischen den Kanälen $K = 0-4$ und die Anzahl der gemessenen Retikulozyten N_R durch Summierung der Kanalinhalt zwischen den Kanälen $K = 5-63$ ermittelt. Daraus errechnete sich der Retikulozytenwert zu $R = N_R / (N_E + N_R)$.

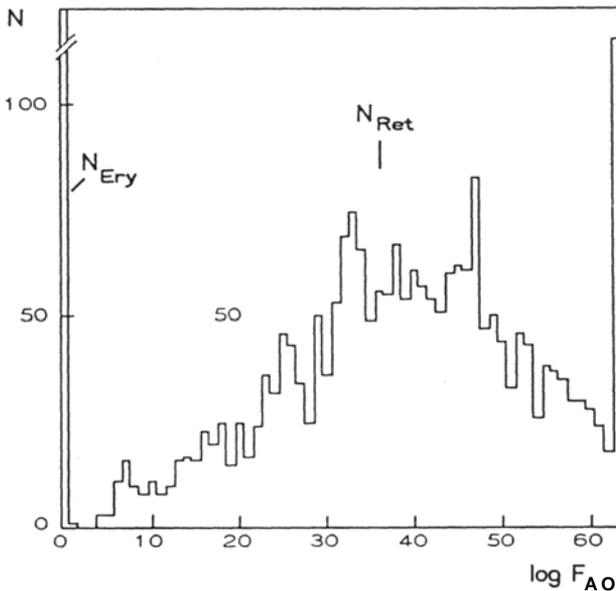


Abb. II.8b Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten von Kaninchen nach AO-Färbung. Die Erythrozyten werden links in den Kanälen 0-4 registriert.

Kalibrierung

Da der Meßbereich von 1,5 Dekaden der logarithmischen Verstärker nicht ausreichte, um die Fluoreszenzverteilung von Erythrozyten und Retikulozyten gleichzeitig zu messen, wurde die Verstärkung der Fluoreszenzsignale so kalibriert, daß die Erythrozyten in den Kanälen 0-4 registriert wurden und die Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten in den Kanälen 5-63 lag.

Zu dieser Kalibrierung wurden grün fluoreszierende mono-disperse Latexkugeln mit einem Durchmesser von $0,82\ \mu\text{m}$ (Polybead Fluorescent Microspheres, Polyscience Inc., Warrington) verwendet. Die Fluoreszenz dieser Partikel wurde mit einem Bandpaßfilter (BP 510-560) gemessen und die Hochspannung am Photomultiplier so eingestellt, daß die Signalhöhe am Ausgang des Vorverstärkers 7 V betrug. Anschließend wurde zur Messung der Blutzellen der Bandpaßfilter durch einen roten Kantenfilter (RG 630) ersetzt.

Zur Messung der Kleinwinkelstreuung wurde die Hochspannung am Photomultiplier so eingestellt, daß die Signale von Erythrozyten und Retikulozyten etwa in den Kanälen 30-40 lag. Die Fluoreszenzsignale der ungefärbten Erythrozyten waren um mehr als zwei Größenordnungen geringer als die Fluoreszenzsignale gefärbter junger Retikulozyten und lagen daher, bei dieser Einstellung im Grundrauschen ($\sim 30\ \text{mV}$) der Meßelektronik. Zur Triggerung wurden deshalb die Signale des Kleinwinkelstreulichtes gewählt. Dadurch kann die Anzahl der Erythrozyten gemessen werden, obwohl ihre Fluoreszenzsignale im Grundrauschen liegen. Bei dieser Einstellung stimmt der gemessene Retikulozytenwert mit der mikroskopischen Bestimmung überein.

Vergleich der durchflußzytometrischen Methode mit den Ergebnissen einer Auswertung mit dem Mikroskop; Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Messung

Die durchflußzytometrische Methode wurde mit der bereits beschriebenen Methode zur Auszählung der Retikulozyten mit dem Mikroskop verglichen. Es wurden Vergleichsmessungen von Blutproben sowohl mit sehr niedrigen als auch mit sehr hohen Retikulozytenwerten durchgeführt. Blutproben von Kaninchen mit niedrigen Retikulozytenwerten konnten während der Bestrahlungsexperimente gemessen werden. Um Blutproben mit einem hohen Retikulozytenwert herzustellen, wurde bei den Tieren eine Blutungsanämie erzeugt. Dazu wurden bei den Kaninchen an 3 aufeinanderfolgenden Tagen aus einer Ohrvene 4 ml Blut pro kg Körpergewicht entnommen. Der Retikulozytenwert wurde 3 Tage nach der letzten Blutentnahme gemessen.

Die Ergebnisse des Vergleichs beider Methoden sind in Abb. II.9 dargestellt. Die gemessenen Werte zeigten eine gute Übereinstimmung. Der Korrelationskoeffizienten beträgt $r = 0,96$. Die Steigung der Ausgleichsgeraden ist $a = 0,903 \pm 0,044$, d. h. im Mittel wurden im Mikroskop geringfügig höhere Werte gezählt. Der Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse liegt bei $b = 3,0 \times 10^{-3} \pm 1,7 \times 10^{-3}$.

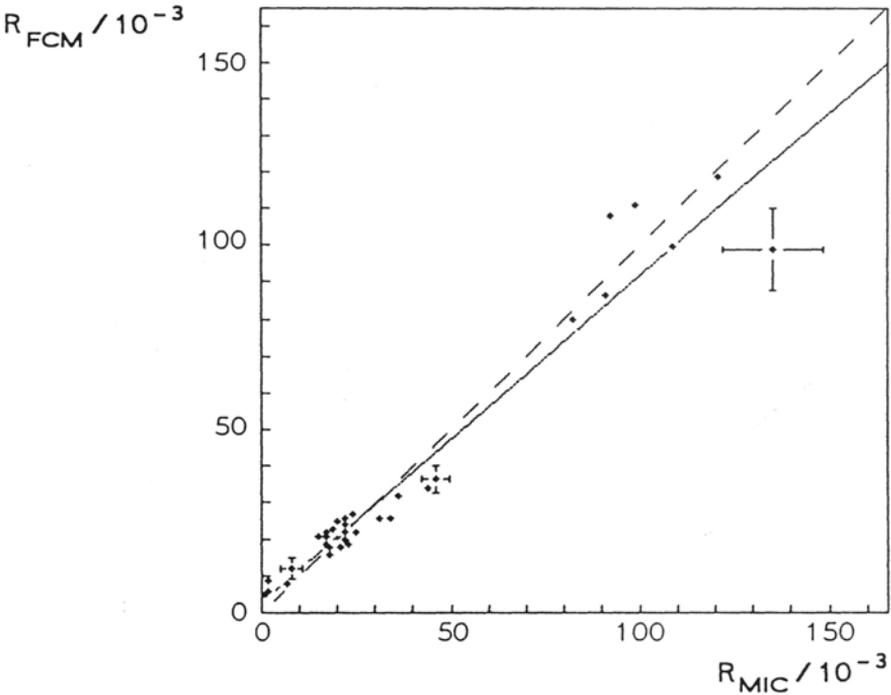


Abb. II.9 Vergleich der Retikulozyten werte gemessen mit dem Durchflußzytometer RFCM (AO-Färbung) und mit dem Mikroskop RMIC (Färbung mit Brillantkresylblau).
 ——— $y = x$; ——— $y = ax + b$ mit $a = 0,903 \pm 0,044$ und $b = 3,0 \times 10^{-3} \pm 1,7 \times 10^{-3}$.
 Die Fehlerbalken kennzeichnen die Streubereiche für $R \pm \sigma$. (Schmitz und Werner, 1986)

Bei Proben mit Retikulozytenwerten unter $R = 3 \times 10^{-3}$ wurden bei der Auswertung mit dem Mikroskop mindestens 20 Retikulozyten gezählt. Bei allen anderen Proben wurden 100 Retikulozyten gezählt. Der relative Fehler beträgt $s/R = 0,2$ für die Werte und $R = 3 \times 10^{-3}$ und $s/R = 0,1$ für Werte über $R = 3 \times 10^{-3}$.

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen, wurden vom gleichen Blut mehrere Proben hergestellt und jeweils mehrere Messungen durchgeführt. Die Meßwerte sind in Tab. II.3 zusammengefaßt. Die

Ergebnisse zeigen, daß die Streuung der Meßwerte der gleichen Probe etwa die gleiche ist wie die Streuung der Meßwerte verschiedener Proben vom gleichen Blut.

Tabelle II.3 Meßwerte einiger Proben vom gleichen Blut. Der mittlere Retikulozytenwert der Proben ist $10,3 \times 10^{-3} \pm 1,19 \times 10^{-3}$. Die Streuung der Meßwerte einer Probe ist etwa die gleiche wie die Streuung der Meßwerte verschiedener Proben vom gleichen Blut.

Probe	R/10-3	R710-3	s/10-3	s/R
1	11,5; 10,7; 12,8; 10,5; 9,3; 9,7	10,8	1,3	0,12
2	10,8; 8,6; 9,0; 8,2; 9,0; 8,2	9,0	1,1	0,12
3	10,4; 10,0; 10,8; 9,2; 9,2	9,9	0,7	0,07
4	8,5; 8,4; 10,7; 10,1; 9,8; 10,7	9,7	1,0	0,10
5	12,6; 11,9; 10,8; 12,5; 13,0	12,1	0,9	0,07

Der Einfluß der Färbedauer wurde durch mehrmaliges Messen verschiedener Proben über eine Zeit von 5 min bis 5 Stunden nach Anfärbung der Zellen untersucht. Dabei wurde die Verstärkung der Photomultiplier nicht verändert. Bei einer Inkubationszeit zwischen ca. 30 min und 5 h liefert die Methode Ergebnisse, die innerhalb des oben genannten Streubereichs liegen und gut mit den Werten der manuellen Auswertung übereinstimmen (Abb. II.10).

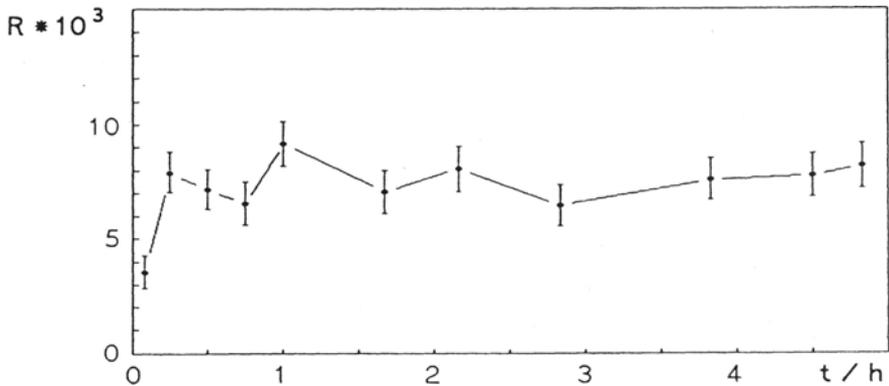


Abb. 11.10 Abhängigkeit des gemessenen Retikulozytenwertes von der Zeit nach Anfärbung mit AO. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Meßergebnisse mehrerer Proben vom gleichen Blut.

Durchflußzytometrische Messung des Retikulozytenwertes im peripheren Blut des Menschen

Farbstoff

Zur Verbesserung der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen des Retikulozytenwertes in menschlichem Blut wurde der speziell zu diesem Zweck neu entwickelte Fluoreszenzfarbstoff Thiazolorange (TO) verwendet. Thiazolorange (TO) besitzt einige Vorteile gegenüber dem für die Tierexperimente verwendeten Farbstoff Acridinorange (AO), wodurch der Untergrund bei der Messung reduziert werden kann. Der interkalierende Farbstoff Thiazolorange bindet sowohl an DNA als auch an RNA durch den starken Bindungstyp. Durch die Bindung von TO an RNA erhöht sich die Quantenausbeute etwa um den Faktor $\Phi_{\text{TO-RNA}}/\Phi_{\text{TO}} \sim 3000$ (Lee et al. 1986). Bei der Bindung von AO an RNA ergibt sich dagegen nur eine geringe Erhöhung der Quantenausbeute von $\Phi_{\text{AO-RNA}}/\Phi_{\text{AO}} \sim 5$.

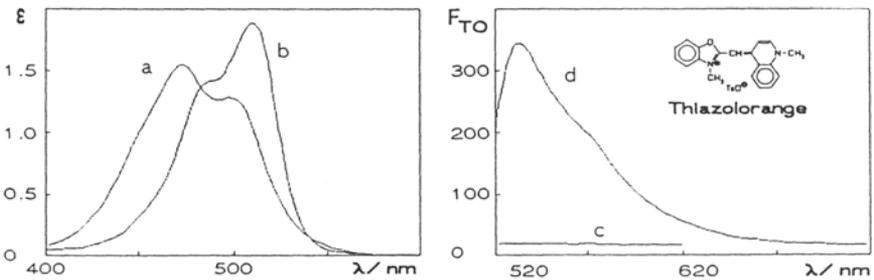


Abb. 11.11 Absorptionsspektren und Emissionsspektren von Thiazolorange (TO).
Kurve a: Absorptionsspektrum von TO (5×10^{-5} M in PBS)
Kurve b: Absorptionsspektrum von TO (5×10^{-6} M in PBS) mit RNA (1 mg/ml)
Kurve c: Emissionsspektrum von TO (1×10^{-6} M, Anregungswellenlänge $\lambda = 510$ nm)
Kurve d: Emissionsspektrum von TO (1×10^{-6} M) mit RNA (0,1 mg/ml)
Fluoreszenz F_{TO} in willkürlichen Einheiten (nach Lee et al. 1986).

Anfärbung der Blutzellen

Eine Stammlösung einer Konzentration von 1 mg/ml Thiazolorange in Methanol wurde im Verhältnis 1:10000 in PBS mit 2 mM EDTA und 2 g/l NaN_3 verdünnt. 5 μl Vollblut werden in 1 ml dieser Farblösung verdünnt und eine Stunde bei 20°C inkubiert. Gleichzeitig wurde eine ungefärbte Probe hergestellt, wobei das Blut im gleichen Verhältnis mit der Pufferlösung ohne Farbstoff verdünnt wurde.

Messung

Mit dem Durchflußzytometer (Ortho Diagnostic Systems, Cytofluorograph 30 H) wurden die Signalhöhen der Fluoreszenz im Wellenlängenintervall 510 nm-560 nm und der Kleinwinkelstreuung (1° - 5° zur Achse des Laserstrahls) der verschiedenen Blutzellen gemessen. Die Fluoreszenz wurde mit einem Bandpassfilter (BP 510-560, Fa. Schott) bestimmt.

Das Verhältnis der Intensitäten der Fluoreszenzsignale von Erythrozyten F_E und jungen gefärbten Retikulozyten F_R beträgt etwa $F_R/F_E = 1000$. Um sowohl die Autofluoreszenz der Erythrozyten als auch die Fluoreszenzverteilung der gefärbten Retikulozyten bei der gleichen Verstärkungseinstellung registrieren zu können, wurde ein logarithmischer Verstärker mit einem Meßbereich von über 3 Dekaden verwendet. Dieser Verstärker stand erst für diese Experimente zur Verfügung. Die Signale der Kleinwinkelstreuung wurden mit einem linearen Verstärker gemessen und dienten gleichzeitig zur Triggerung. Die Daten wurden als zweiparametrisches Histogramm mit 128×128 (bzw. 256×256) Kanälen mit einem Personal-Computer (Toshiba T300) dargestellt, ausgewertet und abgespeichert (Krämer, 1989).

Abb. II.12a zeigt ein solches zweiparametrisches Histogramm von menschlichem Blut. Folgende Blutzellen können unterschieden werden: Erythrozyten (E), Retikulozyten (R), weiße Blutzellen (WBZ) und Thrombozyten (T). Erythrozyten, Retikulozyten und weiße Blutzellen sind etwa gleich groß und liefern deshalb gleiche Signalhöhen der Kleinwinkelstreuung. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Fluoreszenzintensität. Die Erythrozyten werden nicht angefärbt und zeigen deshalb nur eine geringe Autofluoreszenz. Da die Retikulozyten noch restliche RNA enthalten, die von dem Fluoreszenzfarbstoff TO angefärbt wird, ist die Fluoreszenzintensität dieser Zellen größer. Die weißen Blutzellen enthalten Zellkerne, die ebenfalls angefärbt werden. Sie liefern sehr hohe Fluoreszenzsignale und werden in den Kanälen am rechten Rand gezählt. Thrombozyten fluoreszieren etwa mit der gleichen Intensität wie Retikulozyten, sie lassen sich aber aufgrund ihrer Größe und entsprechend kleineren Kleinwinkelstreulicht-Signalen von diesen unterscheiden. Durch Einstellen eines entsprechenden Fensters und Projektion des Fensters auf die Fluoreszenzachse F_{TO} kann die Fluoreszenzverteilung von Erythrozyten und Retikulozyten dargestellt werden (Abb. II.12b).

Im Laufe der Reifung der Retikulozyten wird die noch vorhandene RNA kontinuierlich abgebaut. Die Fluoreszenzintensität junger angefarbter Retikulozyten ist entsprechend höher als die alter Retikulozyten, in denen nur noch sehr wenig RNA vorhanden ist. Die Fluoreszenz-

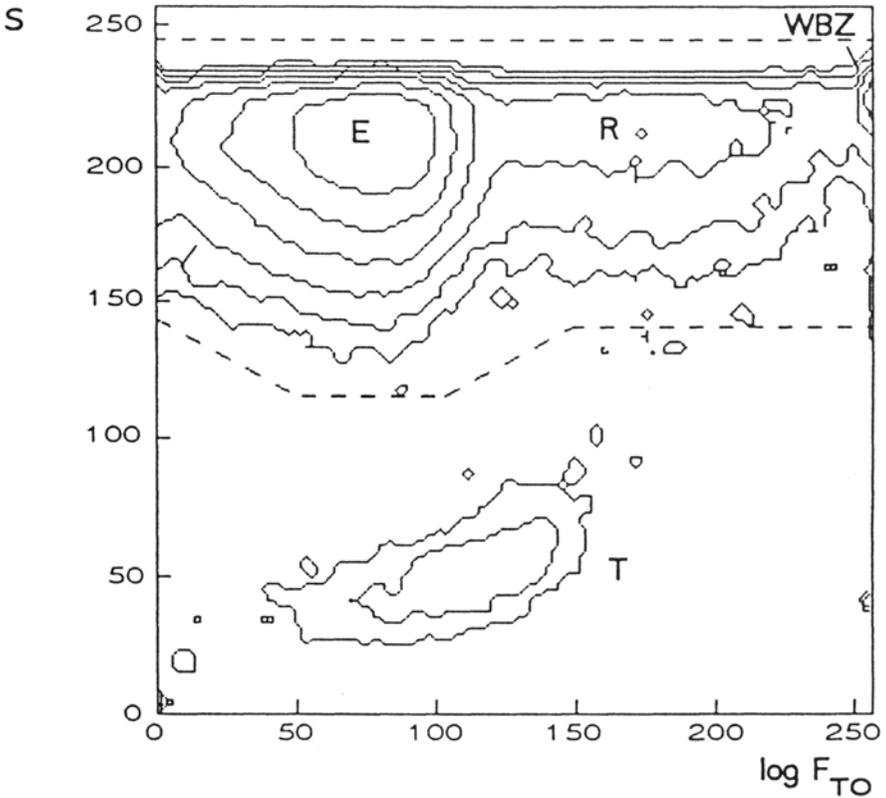


Abb. II.12a Zweiparameter – Histogramm von menschlichem Blut nach TO-Färbung. Die Höhenlinien entsprechen den Niveaus 2, 4, 8, 16, 32, 64 und 128. Auf diese Abszisse ist der Logarithmus der grünen TO-Fluoreszenz, F_{10} , dargestellt, auf der Ordinate die Intensität des Kleinwinkelstreulichtes, S .

Verteilung der Retikulozyten ist deshalb sehr breit und geht stetig in die Autofluoreszenz der Erythrozyten über. Eine genaue Grenze zwischen Erythrozyten und Retikulozyten kann deshalb nicht angegeben werden. Die obere Grenze der Autofluoreszenz der Erythrozyten wurde deshalb bei den Experimenten durch Messung einer ungefärbten Probe bestimmt. Als Grenze zwischen Erythrozyten und Retikulozyten wurde die Kanalnummer definiert, oberhalb der keine ungefärbten Zellen mehr registriert wurden (Abb. 11.13). Als Retikulozyten wurden die Zellen gezählt, die in ihrer Fluoreszenzintensität zwischen dieser Grenze und der Fluoreszenzintensität weißer Blutzellen liegen.

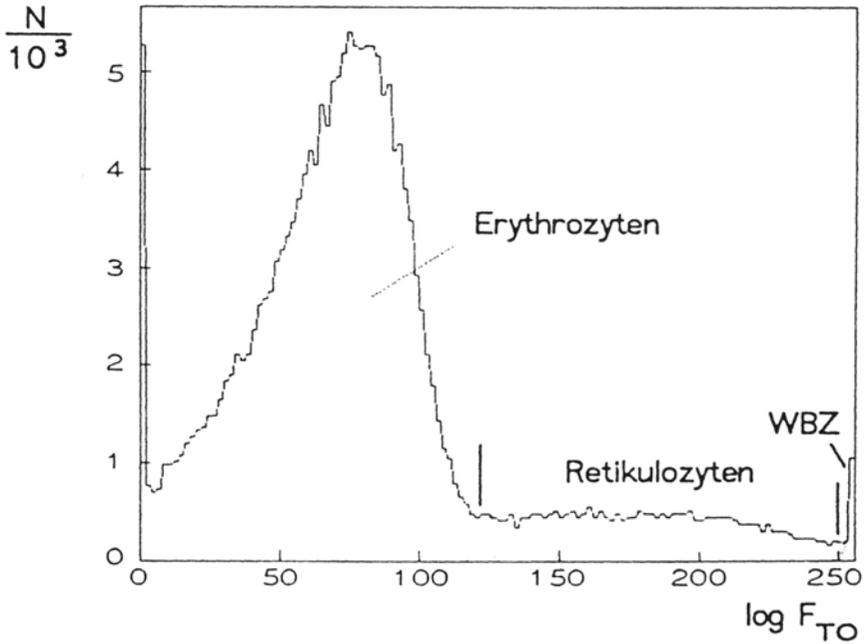


Abb. II.12b Fluoreszenzverteilung von Erythrozyten und Retikulozyten durch Projektion des in Abb. II. 12a eingezeichneten Fensters auf die Fluoreszenzachse. Bei der Probe wurde ein Retikulozytenwert von $R = 123 \times 10^{-3}$ gemessen.

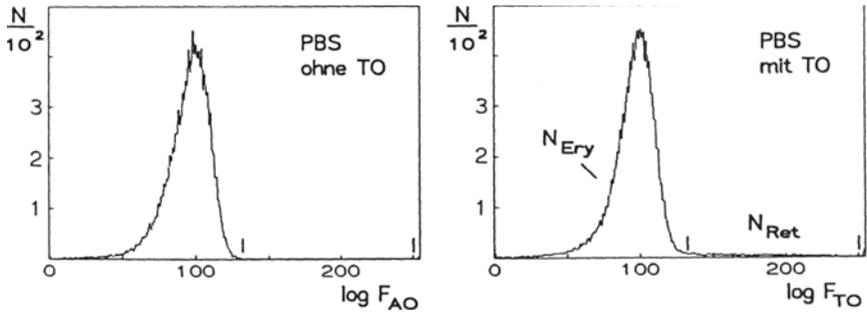


Abb. 11.13 Fluoreszenzverteilung einer ungefärbten (links) und einer mit TO gefärbten (rechts) Blutprobe. Als Grenze zwischen Erythrozyten und Retikulozyten wurde die Kanalnummer definiert, oberhalb der keine ungefärbten Blutzellen mehr registriert wurden. Bei dieser Blutprobe wurde ein Retikulozytenwert von $R = 2,5 \times 10^{-3}$ gemessen.

Vergleich der durchflußzytometrischen Methode mit den Ergebnissen einer Auswertung mit dem Mikroskop; Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Messung

Die durchflußzytometrische Bestimmung des Retikulozytenwertes nach Anfärben mit TO wurde ebenfalls mit einer manuellen Auswertung mit dem Mikroskop verglichen. Parallel zu Routinebestimmungen des Retikulozytenwertes mit dem Mikroskop nach Brillantkresylfärbung im haematologischen Labor der Universitätsklinik Frankfurt wurden durchflußzytometrische Messungen durchgeführt. Mit dem Mikroskop wurden jeweils 1000 Zellen und mit dem Durchflußzytometer ca. 10^5 Zellen ausgewertet.

Ein Vergleich der Ergebnisse ist in Abb. 11.14 dargestellt. Die Daten zeigen eine gute Übereinstimmung. Lineare Regression ergibt eine Steigung von $a = 1,02 \pm 0,06$ und einem Schnittpunkt mit der y-Achse bei $1,33 \times 10^{-3} \pm 2,22 \times 10^{-3}$. Der Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,83$.

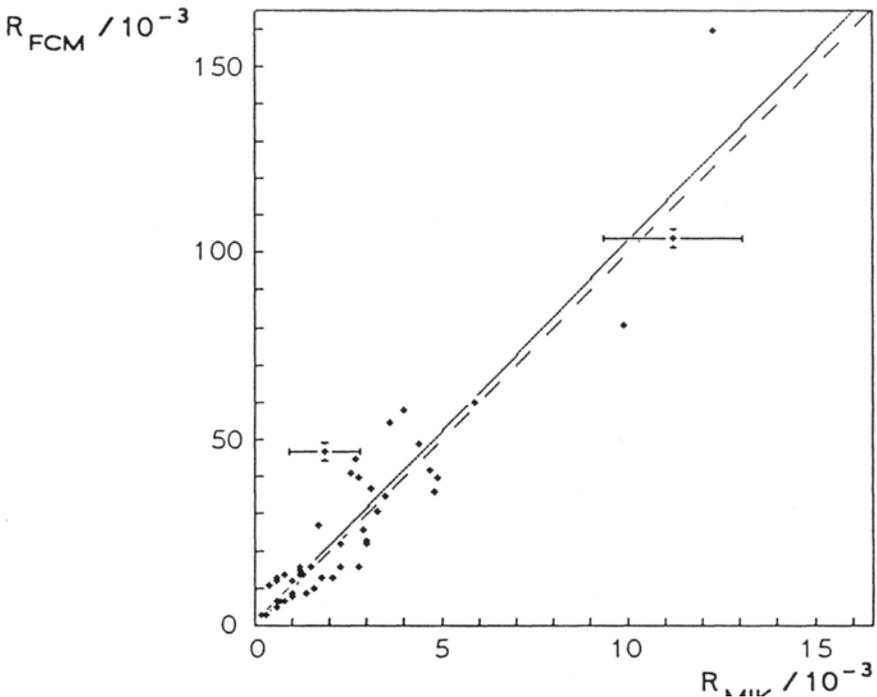


Abb. 11.14 Vergleich der Retikulozytenwerte, gemessen mit dem Durchflußzytometer R_{FCM} (TO-Färbung) und mit dem Mikroskop R_{MIC} (Färbung mit Brillantkresylblau).
 --- $y = x$; — $y = ax + b$ mit $a = 1,02 \pm 0,06$ und $b = 1,33 \times 10^{-3} \pm 2,22 \times 10^{-3}$

Die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit der Methode wurde durch mehrfache Messung mehrerer Proben sowohl vom gleichen Blut als auch von Blut mit unterschiedlichen Retikulozytenwerten getestet. Tab. II.4 zeigt einzelne Meßergebnisse von 5 Proben, die aus dem gleichen Blut hergestellt wurden. Die Streuung der einzelnen Meßwerte einer Probe ist etwas geringer als die Streuung der Meßwerte verschiedener Proben vom gleichen Blut. Tab. II.5 zeigt die Meßergebnisse verschiedener Blutproben mit unterschiedlichen Retikulozytenwerten. Der relative Fehler s/\bar{R} nimmt mit höheren Meßwerten ab.

Der relative Fehler der mit dem Mikroskop bestimmten Retikulozytenwerte liegt nach Angaben des haematologischen Labors der Universitätsklinik bei etwa $s/\bar{R} = 0,2-0,3$.

Tabelle II.4 Meßwerte einiger Proben vom gleichen Blut. Der mittlere Retikulozytenwert der Proben ist $17,8 \times 10^{-3} \pm 1,44 \times 10^{-3}$. Die Streuung der Meßwerte einer Probe ist etwas geringer als die Streuung der Meßwerte verschiedener Proben vom gleichen Blut.

Probe	$R/10^{-3}$	$\bar{R}/10^{-3}$	$s/10^{-3}$	s/\bar{R}
1	18,3; 19,3; 18,7; 19,6; 20,0	19,2	0,68	0,04
2	17,4; 17,9; 18,0; 18,1	17,9	0,31	0,02
3	15,6; 15,9; 15,7; 15,7; 15,5; 15,3	15,5	0,46	0,03
4	18,8; 17,8; 19,6; 19,7	18,8	1,01	0,05
5	17,5; 17,2; 17,1; 17,4; 18,1	17,5	0,39	0,02

Tabelle II.5 Meßergebnisse einiger Blutproben mit unterschiedlichen Retikulozytenwerten. Der relative Fehler s/\bar{R} nimmt mit zunehmendem Retikulozytenwert R der Probe ab.

Probe	$R/10^{-3}$	$\bar{R}/10^{-3}$	$s/10^{-3}$	s/\bar{R}
1	9,4; 6,6; 7,7; 7,3; 8,0	7,8	1,0	0,13
2	14,6; 13,7; 13,8; 13,1; 13,7	13,8	0,5	0,04
3	19,2; 17,9; 15,5; 18,8; 17,5	17,8	1,4	0,08
4	25,4; 26,5; 42,2; 25,9; 28,7; 24,1	25,8	1,7	0,07
5	48,9; 45,5; 45,4; 43,7; 44,0	45,5	2,1	0,05
6	102,7; 104,4; 101,8; 110,1; 104,2	104,6	3,2	0,03
7	158,2; 160,5; 163,6; 157,6; 163,4	160,7	2,8	0,02

Die Färbung mit TO ist nach 15-20 min stabil, d. h. die Fluoreszenz der Retikulozyten nimmt danach nicht mehr zu. Für eine Abschätzung der Haltbarkeitsdauer der gefärbten Proben wurden mehrere Messungen von 6 Proben des gleichen Blutes über einen Zeitraum von 20 min bis 46 Stunden nach Anfärbung durchgeführt (Abb. 11.15). Es zeigte sich, daß die Proben möglichst noch am Tag der Anfärbung gemessen werden sollten, da sich die Qualität der Histogramme danach verschlechtert. Die Verteilungen verbreiterten sich und der Untergrund nahm zu. Die Histogramme waren dann schlechter auszuwerten, wodurch sich größere Abweichungen der Meßergebnisse der einzelnen Proben ergaben.

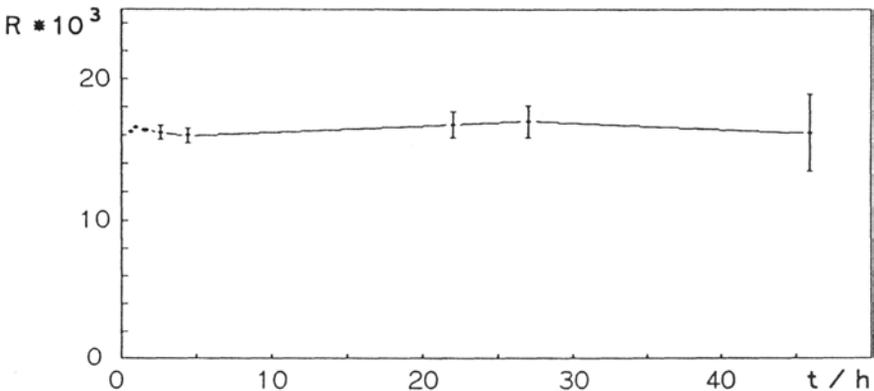


Abb. 11.15 Abhängigkeit des gemessenen Retikulozytenwertes von der Zeit nach Anfärbung mit TO. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Meßergebnisse mehrerer Proben des gleichen Blutes. Die Proben sollten möglichst am gleichen Tag gemessen werden, da die Qualität der Histogramme danach schlechter wird und deshalb die Streuung der Meßergebnisse danach zunimmt.

Beeinflussung der Meßergebnisse

Die Messung des Retikulozytenwertes liefert bei Anwesenheit von Howell-Jolly-Körperchen zu hohe Werte. Bei diesen Körperchen handelt es sich um Einschlüsse in Erythrozyten, die DNA enthalten. Diese DNA wird von dem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Die Fluoreszenzintensität von Erythrozyten mit solchen Howell-Jolly-Körperchen liegt im gleichen Bereich wie die Fluoreszenzintensität der Retikulozyten und ist bei der Messung deshalb nicht von diesen zu unterscheiden. Unter normalen Bedingungen werden solche Zellen sofort von der Milz abgebaut (Abb. 11.16). Howell-Jolly-Körperchen werden nach Milzexstirpation, selten auch bei Hämolyse und megaloblastischen Anämien beobachtet.

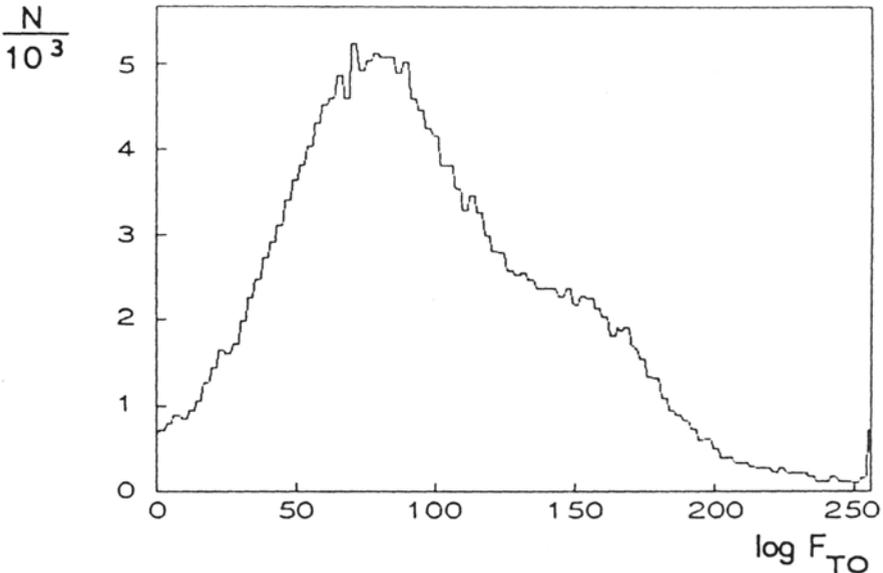


Abb. 11.16 Histogramm einer Blutprobe von einem Patienten nach Milzexstirpation. Wegen der Anwesenheit eines hohen Anteils von Erythrozyten mit Howell-Jolly-Körperchen ist eine Unterscheidung von Erythrozyten und Retikulozyten nicht möglich.

Retikulozytenwert im Blut von Kaninchen nach Bestrahlung

Vorbemerkung

Im folgenden Kapitel soll die Wirkung einer Ganzkörperbestrahlung auf die Erythropoese von Kaninchen mit Hilfe einer neuen durchflußzytometrischen Technik näher untersucht werden. Dabei geht es um die Abhängigkeit des Retikulozytenwertes von der Zeit nach Bestrahlung und von der Dosis. Als zusätzliche Größen müssen dabei auch die Altersverteilung der Retikulozyten und ihre Veränderungen sowie die Eisenaufnahmerate pro Retikulozyt als Funktion der Zeit nach Bestrahlung gemessen werden. Diese Untersuchungen dienen dem Ziel, aus den Veränderungen dieser Parameter nach einer Ganzkörperbestrahlung die Dosis im Knochenmark abschätzen zu können. Insbesondere sollen die Genauigkeit einer solchen „Biologischen Dosimetrie“ analysiert und die wesentlichen Parameter detailliert herausgearbeitet werden, die diese Genauigkeit beeinflussen.

Es ist schon seit langem bekannt, daß durch ionisierende Bestrahlung, je nach Dosis, die Erythropoese durch Schädigung der Stammzellen im

Knochenmark massiv beeinflusst wird. Insbesondere wurde auch schon früh erkannt, daß eine Messung des Retikulozytenwertes nach Bestrahlung zum Nachweis der Schädigung des Knochenmarks dienen kann, da die Retikulozyten nach Übergang aus dem Knochenmark ins periphere Blut eine relativ kurze Reifungsdauer von nur zwei bis drei Tagen aufweisen (Heilmeyer und Westhäuser, 1932, Seip, 1953, Baldini 1960, Engelbrecht, Remmele, 1969). Schon Langendorff (1936, 1937, 1938) konnte zeigen, daß der Retikulozytenwert in Mäusen nach einer Ganzkörperdosis von etwa 1 bis 3 Gy einer Röntgenbestrahlung wie auch nach fraktionierter Bestrahlung in den ersten zwei Tagen nach Bestrahlung abnahm und später nach Erholung des Knochenmarks wieder zunahm. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Mardersteig (1937, 1938) bei bestrahlten Kaninchen berichtet. Mardersteig untersuchte zusätzlich die Veränderung der Anteile von Retikulozyten in ihren verschiedenen Reifungsstadien nach Heilmeyer und Westhäuser (1932) als Funktion der Zeit nach Bestrahlung. Er konnte zeigen, daß sich diese Verteilung nach Bestrahlung veränderte und daß nach Erholung der Erythropoese zunächst junge Retikulozyten im peripheren Blut auftauchten. Heeren (1948) fand nach einer Dosis von 1 Gy eine Abnahme des Retikulozytenwertes in Mäusen am 2. bis 3. Tag nach Bestrahlung um einen Faktor zwei und zwischen dem 8. und 10. Tag eine Zunahme um den Faktor drei gegenüber unbestrahlten Tieren. Dieser Wiederanstieg war zudem erheblich höher, wenn die Dosis in kurzen Pulsen gegeben wurde. Jacobson und Marks (1949, 1954) untersuchten eine Reihe von hämatologischen Parametern im Blut von Kaninchen nach Bestrahlung. Auch sie konnten nach Dosen bis 8 Gy eine Abnahme des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung und einen Wiederanstieg zwischen dem 9. und 10. Tag nach Bestrahlung beobachten. Hennessy und Huff (1950) fanden bei Ratten schon nach Dosen von 0,05-0,25 Gy innerhalb einer Stunde nach Bestrahlung eine Abnahme der Erythrozyten-Neubildung. Ababei et al. (1968) konnten in bestrahlten Kaninchen nach einer Dosis von 6-7 Gy eine Abnahme des mittleren RNA-Gehaltes von Retikulozyten beobachten. Eltgen et al. (1961) berichteten über eine Abnahme des Retikulozytenwertes in Mäusen mit einem Minimum am zweiten Tag nach Bestrahlung schon nach einer Dosis von 0,75 Gy. Ähnliche Ergebnisse publizierte Otto (1973) nach Bestrahlung von Mäusen mit Röntgenstrahlung und Neutronen. Schon nach Dosen von 0,25 Gy (bei Röntgenbestrahlung) bzw. 0,15 Gy (bei Neutronen) konnte er eine Abnahme des Retikulozytenwertes am zweiten Tag nach Bestrahlung beobachten. Boggs et al. (1978) konnten zeigen, daß in bestrahlten Mäusen die Zeitdauer des Wiederanstiegs des Retikulozytenwertes proportional zur Dosis ist (etwa 6 Tage nach 1 Gy und 11 Tage nach 2 Gy).

Für alle diese Untersuchungen wurden die Retikulozytenwerte durch Auszählen der Zellen im Mikroskop bestimmt. Diese Methode ist jedoch sehr zeitraubend und auch mit erheblichen systematischen Fehlern behaftet. Aus so bestimmten Retikulozytenwerten konnte nur schwer oder nur mit einem sehr großen Aufwand die Strahlendosis abgeschätzt werden. Es wurde deshalb in den vergangenen zwanzig Jahren zunehmend nach neuen Methoden für eine automatische Retikulozytenzählung gesucht. Eder und Mitarbeiter (Eder und Thaer, 1969, Eder et al., 1971) entwickelten z. B. eine neue Retikulozytenzählmethode zur Strahlenschadensdiagnose nach nuklearen Katastrophen. Retikulozyten wurden auf einem Band fixiert und mit einer fluorometrischen Methode nach Anfärbung mit Acridinorange automatisch ausgezählt. Mit dieser Technik konnten Chaudhuri und Mitarbeiter (Chaudhuri et al., 1979, Chaudhuri und Messerschmidt, 1982) bei bestrahlten Mäusen und Kaninchen zeigen, daß der Retikulozytenwert im peripheren Blut nach Bestrahlung abnahm, daß die Zeit bis zum Minimum des Retikulozytenwertes nicht von der Dosis abhing und daß die Zeitdauer bis zum Wiederanstieg und das Maximum des Retikulozytenwertes nach seinem Wiederanstieg dosisabhängig war.

Die bisher vorliegenden und im wesentlichen übereinstimmenden Untersuchungen bei bestrahlten Versuchstieren haben ergeben, daß der Retikulozytenwert nach Bestrahlung möglicherweise ein geeigneter Parameter für eine biologische Dosimetrie sein kann. Aus seiner Abnahme am 2. oder 3. Tag nach Bestrahlung oder aus seiner Zunahme wiederum einige Tage später, beides Parameter, die dosisabhängig zu sein scheinen, läßt sich möglicherweise eine unbekannte Ganzkörperdosis bestimmen. Mögliche Probleme für die Genauigkeit einer solchen biologischen Dosimetrie sind nach wie vor in der Ungenauigkeit der Messung des Retikulozytenwertes zu finden. Es soll daher in diesem Kapitel versucht werden, mit den beschriebenen neuen durchflußzytometrischen Methoden einer Messung des Retikulozytenwertes die Grundlagen einer möglichen biologischen Dosimetrie in einem Tiermodell, dem bestrahlten Kaninchen, zu analysieren. Als weitere Parameter werden dabei auch die Altersverteilung der Retikulozyten sowie ihre Eisenaufnahmerate herangezogen werden.

Schon Mardersteig (1937, 1938) stellte dar, daß sich die Altersverteilung der Retikulozyten nach Bestrahlung veränderte, und Belcher et al. (1959) wiesen nach, daß die Eisenaufnahmerate und die Hämoglobinsynthese in Retikulozytenpopulationen von anämischen bzw. bestrahlten Ratten von deren Altersverteilung abhängt. Chone (1961) konnte Regulationsstörungen beim Eisenstoffwechsel der Erythrozyten von Ratten nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 0,5 und 6 Gy beobachten. Aus all diesen Beobachtungen erhellt, daß auch die Eisenaufnahme in

Retikulozyten von deren Reifungsgrad abhängt und damit möglicherweise die Messung der Eisenaufnahmerate pro Retikulozyt zusätzliche Informationen über die Blutbildung nach Bestrahlung erlaubt.

Statistische Methoden

Die Log-Normalverteilung

Die Mehrzahl quantitativer Daten in der Medizin folgt nicht der Standard-Normalverteilung, sondern asymmetrischen, meist linksgipfligen Häufigkeitsverteilungen. Bei einer solchen Verteilung steigt die Wahrscheinlichkeitsdichte von einem bestimmten Wert an zunächst steil an und läuft nach Erreichen des Maximums zu höheren Werten hin flach aus.

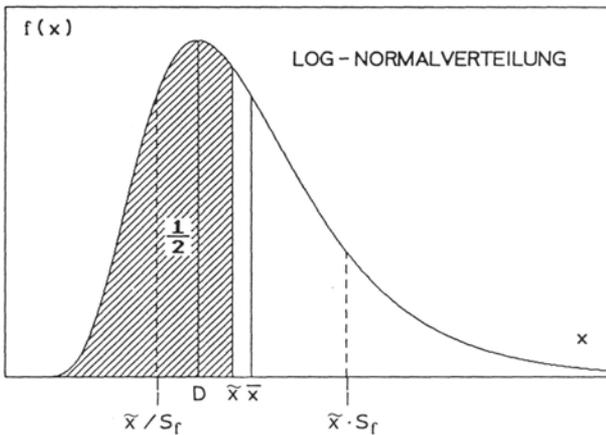


Abb. II.17 Charakteristischer Verlauf der Log-Normalverteilung: Die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion $f(x)$ verläuft asymmetrisch. Sie steigt ab einem bestimmten Wert steil an und läuft nach Erreichen des Dichtemittels D , bei dem das Maximum der Verteilung liegt, zu höheren Werten hin flach aus. Der Median \tilde{x} liegt links vom arithmetischen Mittelwert \bar{x} und teilt die Fläche unter der Kurve in zwei Hälften. 68 % der gesamten Fläche liegt zwischen den Grenzen: Median \tilde{x} /Streu­faktor S_f und Median $\tilde{x} \times$ Streu­faktor S_f .

Die Entstehung solcher asymmetrischer Verteilungen kann anschaulich durch eine einseitige Begrenzung der Variationsmöglichkeit einer Größe erklärt werden. Viele Größen können keine negativen Werte annehmen, ihre Verteilungen sind deshalb links durch den Wert Null begrenzt. Die Verteilungen solcher Größen werden in den meisten Fällen durch eine logarithmische Normalverteilung, kurz Log-Normalverteilung, beschrieben (Abb. 11.17).

Bei der Standard-Normalverteilung wirken die Zufallsgrößen additiv zusammen. Die meisten physiologischen Regelvorgänge sind dagegen durch multiplikatives Zusammenwirken einer Reihe von Faktoren gekennzeichnet. Die meisten physiologischen Größen wie z. B. die relativen Anteile der verschiedenen Zellen im Blut. Konzentrationen verschiedener Stoffe in Körperflüssigkeiten, Blutdruck, Pulsfrequenz usw. folgen deshalb einer Log-Normalverteilung.

Allgemein ist eine Log-Normalverteilung immer dann gegeben, wenn die Faktoren, die einen Meßwert beeinflussen, multiplikativ zusammen wirken. Die Variation des Meßwertes ist dann proportional zum Wert selbst.

Die Log-Normalverteilung wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\varphi(x) = \frac{1}{x \sqrt{2\pi\sigma^2}} \times e^{-\frac{(\ln x - \mu)^2}{2\sigma^2}} \quad \text{für } x > 0 \quad (\text{II.1})$$

$\varphi(x)$ ist die Wahrscheinlichkeitsdichte, μ das arithmetische Mittel der Grundgesamtheit und σ die Standardabweichung der Grundgesamtheit.

Folgen die Daten einer Stichprobe der Log-Normalverteilung, kann der Datensatz durch Logarithmieren aller Meßwerte in eine transformierte, normalverteilte Stichprobe überführt werden. Auf diese Weise ist es möglich, sämtliche statistischen Verfahren anzuwenden, die normalverteilte Werte voraussetzen.

Folgende charakteristische Größen lassen sich für die Stichprobe er rechnen:

$$\text{Median:} \quad \tilde{x} = e^{\left(\frac{\sum \ln x_i}{n}\right)} = e^{\bar{x}_{\ln x_i}} \quad (\text{II.2})$$

$$\text{Streufaktor:} \quad S_f = e^{s_{\ln x_i}} = e^{\sqrt{\frac{n \sum (\ln x_i)^2 - (\sum \ln x_i)^2}{n(n-1)}}} \quad (\text{II.3})$$

$$\text{arithmetischer Mittelwert:} \quad \bar{x} = e^{(\bar{x}_{\ln x_i} - s_{\ln x_i}^2 / 2)} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (\text{II.4})$$

$$\text{Dichtemittel:} \quad D = e^{(\bar{x}_{\ln x_i} - s_{\ln x_i}^2)} \quad (\text{II.5})$$

Dabei ist $\bar{x}_{\ln x_i}$ der arithmetische Mittelwert und $s_{\ln x_i}$ die Standardabweichung der logarithmierten Einzelwerte $\ln x_i$.

Der Median \tilde{x} teilt die Verteilung in zwei Hälften, jeweils die Hälfte der Meßwerte ist kleiner bzw. größer als der Median.

Der Streufaktor S_f beschreibt die Variation der Meßwerte. Mit zunehmendem Streufaktor S_f verschiebt sich der arithmetische Mittelwert \bar{x} vom Median x nach rechts und das Dichtemittel D (Maximum der Verteilung) um den doppelten Betrag nach links (Abb. II.17). Durch Multiplikation bzw. Division des Medians \bar{x} mit dem Streufaktor S_f werden die Grenzen berechnet, innerhalb der 68 % derer Meßwerte x_i liegen. Für die Wahrscheinlichkeit $P = 0,68$ gilt also:

$$\bar{x} / S_f \leq x_i \leq \bar{x} \times S_f \quad (\text{II.6})$$

Die Endergebnisse haben die Form:

$$\bar{x} \times S_f^{\pm 1} \quad (\text{II.7})$$

In der Medizin werden häufig die Streuungsintervalle für die Wahrscheinlichkeit $P = 0,95$ angegeben:

$$\bar{x} \times S^{\pm 1,96} \quad (\text{II.8})$$

Fehlerfortpflanzung

Die Multiplikation bzw. Division von Medianen ist gleichbedeutend mit der Addition bzw. Subtraktion der arithmetischen Mittelwerte der logarithmierten Einzelwerte:

$$\bar{x} \times \bar{y} = e^{\bar{x}_{\ln x_i} + \bar{y}_{\ln y_i}} \quad (\text{II.9})$$

$$\text{bzw.:} \quad \bar{x} / \bar{y} = e^{\bar{x}_{\ln x_i} - \bar{y}_{\ln y_i}} \quad (\text{II.10})$$

Für die zugehörigen Standardabweichungen der logarithmierten Einzelwerte gelten deshalb, vorausgesetzt die Daten sind stochastisch unabhängig, die Regeln der Gaußschen Fehlerfortpflanzung:

$$s_z = \sqrt{\left(\frac{\partial z}{\partial x} \times s_x\right)^2 + \left(\frac{\partial z}{\partial y} \times s_y\right)^2} \quad (\text{II.11})$$

Für die Addition und Multiplikation der Mittelwerte folgt daraus:

$$\bar{x}_{\ln x} + \bar{y}_{\ln y} \pm \sqrt{s_{\ln x_i}^2 + s_{\ln y_i}^2} \quad (\text{II.12})$$

$$\bar{x}_{\ln x} - \bar{y}_{\ln y} \pm \sqrt{s_{\ln x_i}^2 + s_{\ln y_i}^2} \quad (\text{II.13})$$

Die Streubereiche für Produkte und Quotienten von Medianen mit zugehörigen Streufaktoren können dann wie folgt berechnet werden:

$$S_f = e^{\sqrt{s_{\ln x_i}^2 + s_{\ln y_i}^2}} \quad (\text{II.14})$$

Zur Anpassung einer Log-Normalverteilung an die Daten ändert sich Gleichung II.1 wie folgt:

$$\varphi(x) = \frac{1}{x \sqrt{2\pi s_{\ln x_i}^2}} \times e^{-\frac{(\ln x - \ln \tilde{x})^2}{2 s_{\ln x_i}^2}} \quad \text{für } x > 0 \quad (\text{II.15})$$

Dadurch wird die diskrete Häufigkeitsverteilung in eine kontinuierliche Wahrscheinlichkeitsverteilung überführt. Dabei ist $\varphi(x)$ die Wahrscheinlichkeitsdichte für einen Wert x . Die Wahrscheinlichkeit P dafür, daß der Wert x_i innerhalb eines bestimmten Intervall $a \leq x_i \leq b$ liegt, kann durch Integrieren der Wahrscheinlichkeitsverteilung über die entsprechenden Grenzen berechnet werden:

$$P(a \leq x_i \leq b) = \int_a^b \varphi(x) dx \quad (\text{II.16})$$

Die relative Häufigkeit H der Werte einer Stichprobe ist eine Schätzung der Wahrscheinlichkeit P für ein entsprechendes Werteintervall.

Retikulozytenwert bei unbestrahlten Kaninchen

Inter-individuelle Variation des Retikulozytenwertes

Im folgenden soll zunächst die Variation der Retikulozytenwerte bei unbestrahlten Kaninchen näher untersucht werden. Solche Untersuchungen sind notwendig, da bei einer möglichen biologischen Dosimetrie durch eine Messung des Retikulozytenwertes zu einer bestimmten Zeit nach Strahlenexposition der nicht unbedingt genau bekannte Retikulozytenwert vor Bestrahlung und seine mögliche zeitliche Veränderung von wesentlicher Bedeutung sind. Es wurden deswegen die Retikulozytenwerte einer Gruppe von unbestrahlten Kaninchen gemessen und ihre Verteilung (inter-individuelle Variation) genau analysiert.

Über einen Zeitraum von 2-3 Wochen vor Bestrahlung wurden bei den insgesamt 38 Kaninchen jeweils vier Messungen des Retikulozytenwertes durchgeführt. Aus diesen Daten wurde die *inter-individuelle* Variation des Retikulozytenwertes unbestrahlter Kaninchen abgeschätzt. Die Häufigkeitsverteilung dieser Werte ist in Abb. 11.18 dargestellt. Für den Median ergab sich $R = 25,1 \times 10^3$ und für den Streufaktor $S_f = 1,29$. Mit Gleichung:

$$\varphi(R) = \frac{1}{R \sqrt{2\pi s_{\ln x_i}^2}} \times e^{-\frac{(\ln R - \ln R)^2}{2 s_{\ln x_i}^2}} \quad (\text{II.17})$$

wurde an die Daten eine Log-Normalverteilung angepaßt. Dabei ist φ (R) die Wahrscheinlichkeitsdichte für einen bestimmten Wert von R .

Aus Abb. 11.18 ist zu erkennen, daß die Retikulozytenwerte im Blut von den einzelnen Kaninchen zwischen $R = 12 \times 10^{-3}$ und $R = 46 \times 10^{-3}$ schwanken, das heißt um den Faktor vier unterschiedlich sein können. Die Konsequenzen dieser erheblichen inter-individuellen Variation des Retikulozytenwertes von Kaninchen für eine Dosisabschätzung nach Ganzkörperbestrahlung werden später ausführlich diskutiert.

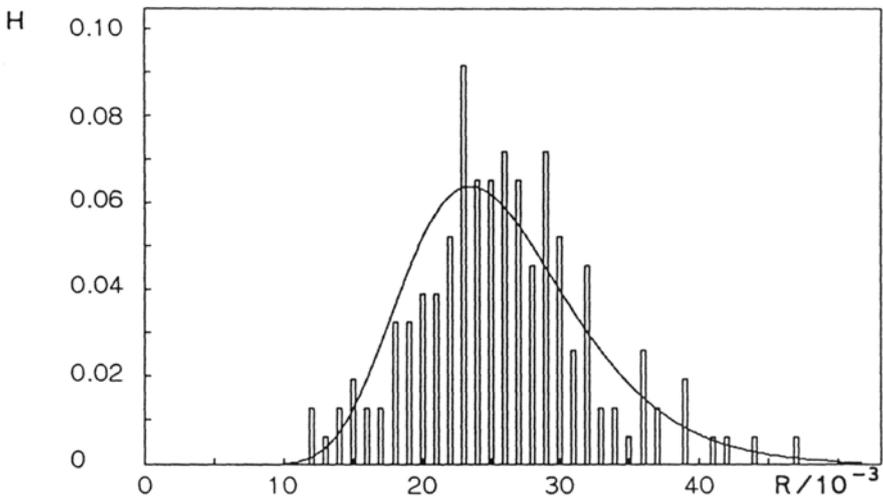


Abb. 11.18 Relative Häufigkeit der Retikulozytenwerte von unbestrahlten Kaninchen. Über einen Zeitraum von 2-3 Wochen wurden jeweils 4 Blutproben von insgesamt 38 Versuchstieren analysiert. An die Daten wurde eine Log-Normalverteilung angepaßt. Der Median betrug $R = 25,1 \times 10^{-3}$ und der Streufaktor $S_f = 1,29$.

Intra-individuelle Variation des Retikulozytenwertes

Wenn der Retikulozytenwert eines Versuchstieres vor einer Bestrahlung bekannt ist, kann möglicherweise eine Dosisabschätzung durch eine weitere Messung *nach* Bestrahlung mit einer größeren Genauigkeit durchgeführt werden. Die Genauigkeit dieser Dosisabschätzung wird dann im wesentlichen durch die zeitliche Variation des Retikulozytenwertes des jeweiligen Versuchstieres und durch eine möglicherweise unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der einzelnen Versuchstiere eingeschränkt. Es soll deswegen im folgenden die *intra-individuelle* Variation des Retikulozytenwertes einzelner Kaninchen, d.h. seine Veränderung als Funktion der Zeit, näher untersucht werden.

Parallel zu den Bestrahlungsexperimenten wurde deshalb der Retikulozytenwert bei insgesamt 8 Kontrolltieren als Funktion der Zeit gemessen. Vor dem Zeitpunkt der Bestrahlung ($t = 0$; Abb. 11.21) wurde den Kaninchen wöchentlich, in der ersten Woche nach Bestrahlung täglich und danach 2 mal pro Woche Blut entnommen und der Retikulozytenwert gemessen. Damit standen von jedem Kaninchen 9-14 Werte zur Verfügung, die in einen Zeitraum von 4-5 Wochen erhoben wurden.

Abb. 11.19, oben, zeigt den Retikulozytenwert von drei Kontrolltieren (B, E, G) als Funktion der Zeit und Abb. 11.19, unten, den Median R der Retikulozytenwerte aller Kontrolltiere als Funktion der Zeit. Wegen der täglichen Blutentnahmen von jeweils 3-5 ml zwischen $t = 0$ (Beginn der Bestrahlungsexperimente) und $t = 5$ d wurde bei den Kaninchen eine leichte Anämie hervorgerufen. Damit wurde den Tieren insgesamt

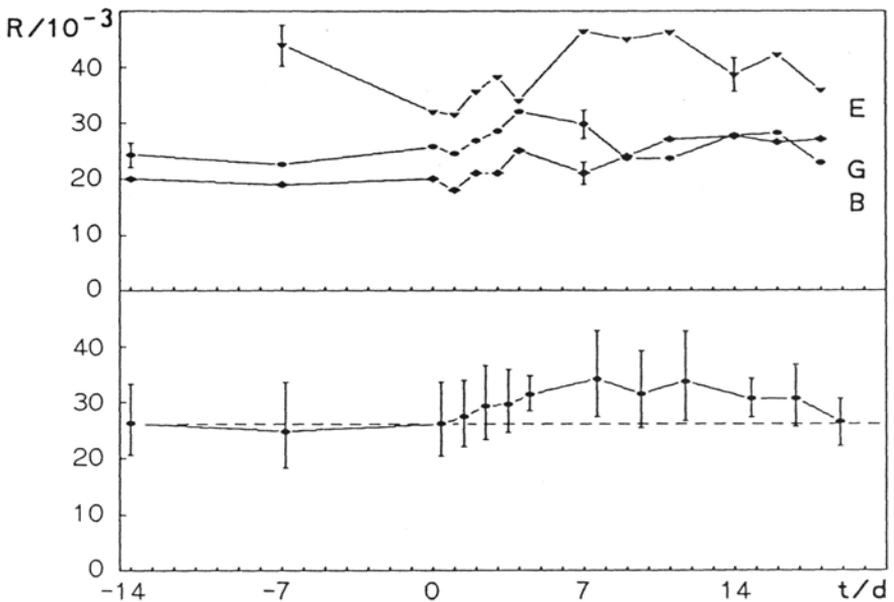


Abb. 11.19 oben: Retikulozytenwert R als Funktion der Zeit für drei unbestrahlte Kaninchen (B, E, G). Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen aus mehreren Einzelmessungen.

unten: Median R des Retikulozytenwertes aller Kontrolltiere als Funktion der Zeit. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Streubereiche $R \times S_r^{\pm 1}$.

Wegen der täglichen Blutentnahmen von jeweils 3-5 ml zwischen den Zeitpunkten $t = 0$ (Beginn der Bestrahlungsexperimente) und $t = 5$ d wurde bei den Kaninchen eine leichte Anämie hervorgerufen. Der Retikulozytenwert stieg deshalb in diesem Zeitintervall etwas an. Danach wurde nur noch alle zwei bis drei Tage Blut entnommen, so daß sich der Retikulozytenwert bei etwas höheren Werten stabilisierte und später wieder auf den Anfangswert absank.

etwa 10 % ihres Blutvolumens (ca. 250 ml) innerhalb dieser 5 Tage entnommen. Der Retikulozytenwert stieg deshalb in diesem Zeitintervall etwas an. Ab $t = 5$ d wurden nur noch alle zwei bis drei Tage Blut entnommen, so daß sich der Retikulozytenwert auf einem etwas höheren Wert stabilisierte und später (bei $t = 18$ d) wieder auf den Normalwert absank.

Tiere mit einem hohen Anfangswert wiesen auch zu späteren Zeiten hohe Werte auf, Tiere mit einem niedrigen Anfangswert zeigten auch zu späteren Zeiten niedrige Werte. Die Kurven der einzelnen Tiere verlaufen im Wesentlichen parallel. Es ist daher zu erwarten, daß die Variation der Retikulozytenwerte der einzelnen Tiere (intra-individuelle Variation) eine geringere Streuung ergibt, als die Werte aller unbestrahlten Kaninchen (inter-individuelle Variation).

Abb. 11.20 enthält Beispiele für die Häufigkeitsverteilungen der Retikulozytenwerte einzelner Kontrolltiere (intra-individuelle Variation) im Vergleich zu der Verteilung der Werte aller 38 unbestrahlten Kaninchen (intra-individuelle Variation).

Aus den Daten wurde für jedes Kaninchen der Median R und der Streufaktor S_f der Retikulozytenwerte berechnet. Der durch die häufigen Blutentnahmen hervorgerufene geringfügige Anstieg der Retikulozytenwerte wurde dabei korrigiert. Dazu wurden die zu verschiedenen

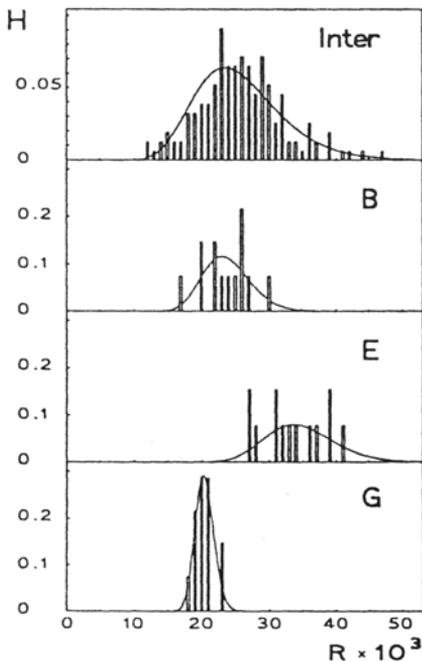


Abb. 11.20 Beispiele für Häufigkeitsverteilungen der Retikulozytenwerte von einzelnen unbestrahlten Kaninchen (intra-individuelle Variation: B, E, G, siehe Tab. 11.6a) im Vergleich zur Häufigkeitsverteilung der Werte aller Kontrollkaninchen (inter-individuelle Variation: Inter).

Zeiten gemessenen Werte $R(t)$ durch den jeweiligen mittleren Anstieg aller Kontrolltiere $R(t)/R(t=0)$ dividiert. Die Ergebnisse sind in Tab. II.6a zusammengefaßt.

Tab. II.6a Median \bar{R} und Streufaktor S_f der Retikulozytenwerte der unbestrahlten Kaninchen. Von jedem der 8 Kontrolltiere wurden über einen Zeitraum von 4-5 Wochen insgesamt η Blutproben genommen.

Tier	$\bar{R} * 10^3$	S_f	n
A	26,4	1,15	9
B	23,5	1,16	14
C	25,4	1,16	12
D	31,2	1,27	12
E	34,4	1,16	13
F	27,4	1,12	11
G	20,3	1,07	14
H	28,6	1,21	11

Verglichen mit dem für die gesamten Daten aller unbestrahlten Kaninchen (inter-individuelle Variation) ermittelten Streufaktor ($S_f = 1,29$), fanden sich für die Werte der einzelnen Kontrolltiere (intra-individuelle Variation) geringere Streufaktoren ($1,07 \leq S_f \leq 1,27$). Als mittlerer Streufaktor ergab sich für die jeweiligen Werte der 8 Kontrolltiere $\bar{S}_f = 1,16$. Die intra-individuelle Variation der Retikulozytenwerte ist deutlich geringer als die inter-individuelle Variation.

Die intra-individuelle Variation der Retikulozytenwerte ist abhängig von dem beobachteten Zeitintervall. Wird die Streuung der Retikulozytenwerte für einen kürzeren Zeitraum berechnet, ergeben sich kleinere Streufaktoren. In Tab. II.6b wurden der Median \bar{R} und der Streufaktor S_f der Retikulozytenwerte der jeweiligen Kontrolltiere für ein kürzeres Zeitintervall von jeweils 5 aufeinander folgenden Tagen berechnet. Die intra-individuelle Variation der Retikulozytenwerte in diesem Zeitraum (mittlerer Streufaktor: $\bar{S}_f = 1,10$) war geringer als die Variation der Werte der Kontrolltiere innerhalb von 4 Wochen (mittlerer Streufaktor: $\bar{S}_f = 1,16$). Große Schwankungen der Werte sind für kurze Zeitintervalle weniger wahrscheinlich.

Tab. II.6b Median \bar{R} und Streufaktor S_f der Retikulozytenwerte der unbestrahlten Kaninchen. Wie Tab. II.6a, jedoch wurden hier nur die Meßwerte von 5 aufeinanderfolgenden Tagen berücksichtigt. Die Daten der einzelnen Versuchstiere wurden vorher auf den geringfügigen Anstieg der Retikulozytenwerte aufgrund der häufigen Blutentnahmen innerhalb dieses Zeitintervalls korrigiert.

Tier	$\bar{R} * 10^3$	S_f	n
A	24,8	1,10	5
B	26,4	1,07	5
C	27,3	1,07	5
D	35,7	1,09	5
E	32,8	1,13	5
F	27,3	1,11	5
G	20,2	1,09	5
H	30,2	1,14	5

Retikulozytenwert bei Kaninchen nach einer Ganzkörperbestrahlung

Meßergebnisse bei den einzelnen Versuchstieren

Die Kaninchen wurden am Betatron mit der bereits beschriebenen Bestrahlungsanordnung bestrahlt. Es wurden 7 Tiere mit 2 Gy, 8 Tiere mit 4 Gy und 7 Tiere mit 8 Gy bestrahlt. Als Kontrollen wurden 8 Kaninchen scheinbestrahlt (siehe auch Abb. 11.19). Nach Bestrahlung wurde der Retikulozytenwert der Kaninchen über einen Zeitraum von 2 Wochen an allen Arbeitstagen gemessen. Außerdem wurde der Retikulozytenwert von allen Kaninchen 14 Tage, 8 Tage und 1 Stunde vor Bestrahlung bestimmt.

Der Verlauf der Retikulozytenwerte der einzelnen Versuchstiere als Funktion der Zeit nach Bestrahlung ist in Abb. 11.21 dargestellt. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung mehrerer Meßergebnisse. Durch die häufigen Blutentnahmen von jeweils ca. 3 ml wird bei den Kaninchen im Verlauf der Untersuchungen die Erythropoese stimuliert. Einige der Kontrolltiere zeigen deshalb eine leichte Zunahme der Retikulozytenwerte.

Die Retikulozytenwerte der einzelnen Kontrolltiere als Funktion der Zeit wie auch die Werte der Tiere vor Bestrahlung zeigen bereits eine

erhebliche Streuung. Der zeitliche Verlauf des Retikulozytenwertes der Tiere innerhalb einer Gruppe ist jedoch sehr ähnlich. Bei den bestrahlten Tieren nimmt der Retikulozytenwert zunächst ab und erreicht bei allen Dosisgruppen am dritten Tag nach Bestrahlung ein Minimum. Bis zu diesem Zeitpunkt verlaufen die Kurven der einzelnen Versuchstiere nahezu parallel. Kaninchen mit einem hohen Retikulozytenwert vor Bestrahlung weisen auch später höhere Werte als die anderen Kaninchen innerhalb der gleichen Dosisgruppe auf.

Die Abnahme des Retikulozytenwertes hängt von der Dosis ab. Bei den mit höherer Dosis bestrahlten Gruppen sinkt der Retikulozytenwert schneller ab und das Minimum liegt entsprechend niedriger.

Ab dem dritten Tag nach Bestrahlung erhöht sich der Retikulozytenwert wieder. Mit zunehmender Dosis verzögert sich der Wiederanstieg des Retikulozytenwertes. Bei den mit höherer Dosis bestrahlten Tieren steigt der Retikulozytenwert später an. Der Verlauf der Kurven der einzelnen Kaninchen während dieser Phase ist jedoch sehr unterschiedlich. Einige Tiere erreichen schon nach kurzer Zeit wieder den Ausgangswert, andere zeigen nur einen sehr langsamen Wiederanstieg des Retikulozytenwertes. Bei einigen Kaninchen geht der Retikulozytenwert bis weit über den Anfangswert hinaus.

Median R der Retikulozytenwerte sämtlicher Versuchstiere in Abhängigkeit von der Zeit

Es wurden die jeweiligen Mediane $R(D)$ der Retikulozytenwerte für eine Gruppe von Versuchstieren berechnet, die bei den einzelnen Experimenten mit der gleichen Dosis bestrahlt wurden.

Abb. 11.22 zeigt für jede Dosis und für die unbestrahlten Tiere den Median der Retikulozytenwerte der jeweiligen Versuchstiere als Funktion der Zeit nach Bestrahlung. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Streubereiche für 68 % der Einzelwerte ($R \times S_f^{\pm 1}$). Wie schon bei den einzelnen Tieren zu sehen war, nimmt auch der Median des Retikulozytenwertes nach Bestrahlung zunächst ab. Etwa am dritten Tag nach Bestrahlung erreicht er ein Minimum. Der Retikulozytenwert in diesem Minimum hängt von der Dosis ab.

Zwischen 4 und 10 Tagen nach Bestrahlung nehmen die Werte wieder zu. Mit zunehmender Dosis steigt der Median der Retikulozytenwerte langsamer an und der Ausgangswert wird entsprechend später erreicht. Bei $D = 2$ Gy ist der Ausgangswert schon 4-5 Tage nach Bestrahlung, bei $D = 8$ Gy erst nach etwa 9-10 Tagen erreicht. Die Kurven der einzelnen Kaninchen zeigen jedoch in dieser Phase einen sehr unterschiedlichen Verlauf (Abb. 11.21) und die Werte lassen insbesondere bei höhe-

ren Dosen eine erhebliche Streuung erkennen. Klare Aussagen über den zeitlichen Verlauf des Retikulozytenwertes in diesem Bereich sind deshalb schwer zu erhalten.

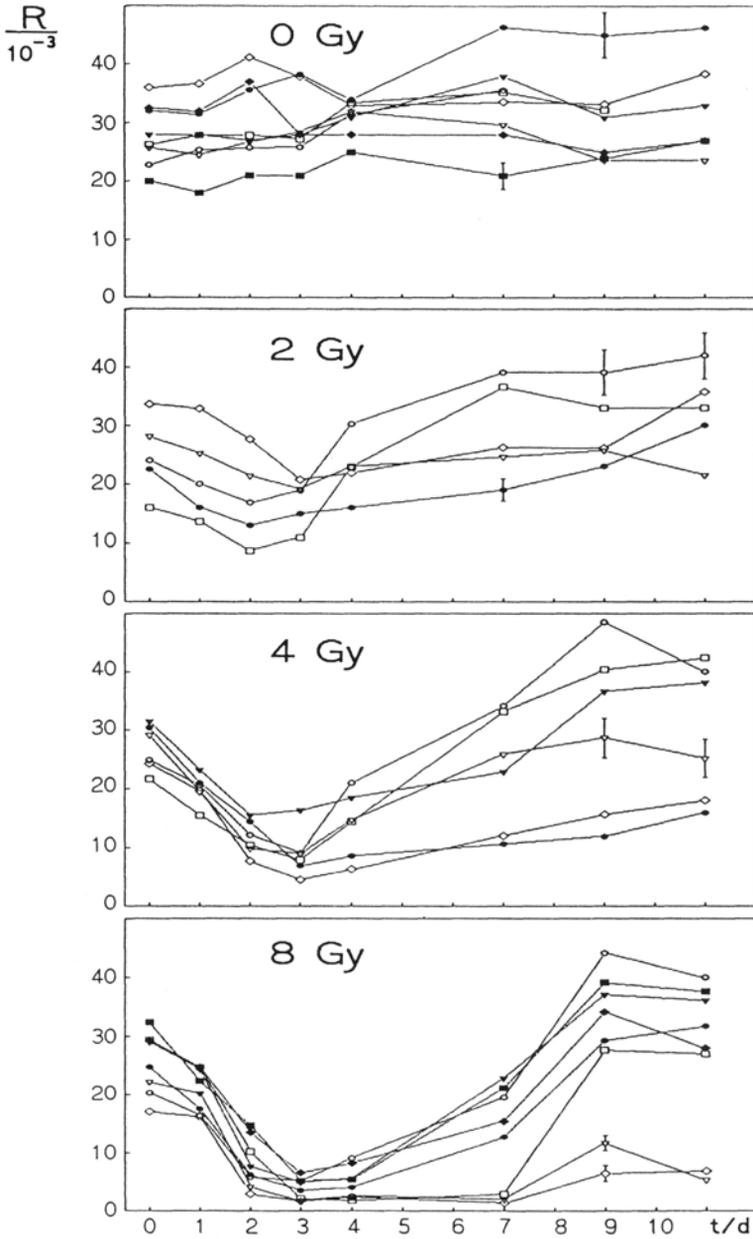
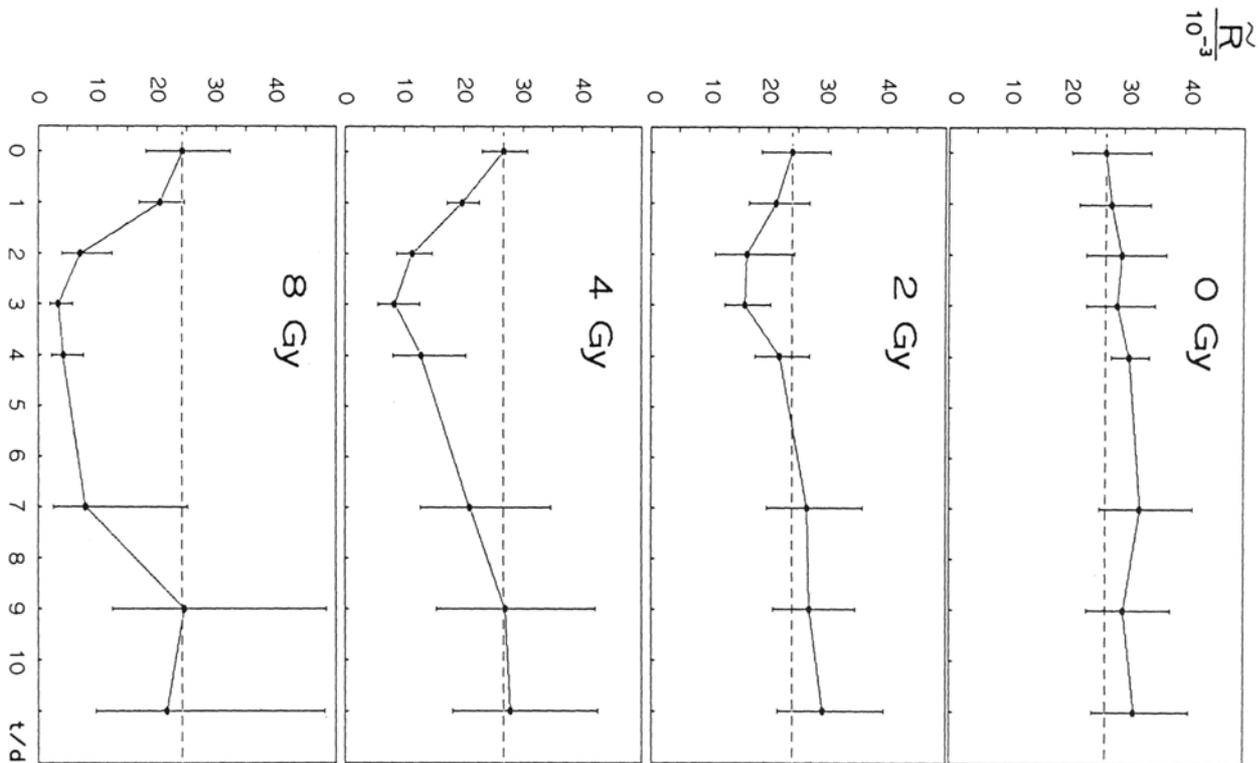


Abb. II.21 Retikulozytenwerte einzelner Versuchstiere als Funktion der Zeit nach Ganzkörperbestrahlung mit $D = 0, 2, 4$ und 8 Gy . Jedes Symbol in den einzelnen Dosisgruppen stellt die Meßdaten für ein Kaninchen dar. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen mehrerer Messungen.

Abb. 11.22 Median R der Retikulozyten werte als Funktion der Zeit nach Ganzkörperbestrahlung mit D = 0, 2, 4 und 8 Gy. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Streubereiche für 68 % ($R \times S_r^{\pm 1}$) der Meßwerte aller Versuchstiere.



Möglichkeiten und Grenzen einer Dosisabschätzung durch Messung des Retikulozytenwertes

Im folgenden sollen mit den Ergebnissen der Messungen der Retikulozytenwerte in Kaninchen nach einer Ganzkörperbestrahlung und der bekannten Variation der Retikulozytenwerte von unbestrahlten Kaninchen die Möglichkeiten und Grenzen einer Dosisabschätzung näher untersucht werden. Dabei ist die Frage zu klären, inwieweit es möglich ist, nur durch Messung des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach einer Ganzkörperbestrahlung oder durch Bestimmung der relativen Abnahme des Retikulozytenwertes zu diesem Zeitpunkt die Ganzkörperdosis zu ermitteln. Bei einer solchen Biologischen Dosimetrie spielt die inter- bzw. intra-individuelle Variation des Retikulozytenwertes eine entscheidende Rolle.

Median \tilde{R}_3 der Retikulozytenwerte sämtlicher Versuchstiere am dritten Tag nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Dosis

Abb. II.23 zeigt den Median des Retikulozytenwertes \tilde{R}_3 für das Minimum am dritten Tag nach Bestrahlung als Funktion der Dosis sowie die Streubereiche für die Irrtumswahrscheinlichkeiten $p_i = 0,33$ und $p_i = 0,05$. Die Werte folgen in guter Näherung einer Exponentialfunktion mit der Gleichung:

$$\tilde{R} = 25,4 \times e^{-0,27 D} \tag{II.18}$$

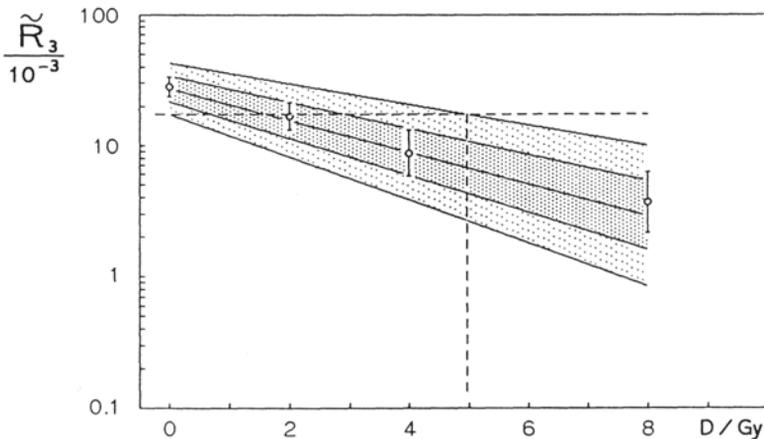


Abb. II.23 Median R_3 des Retikulozytenwertes von Kaninchen sowie Streubereiche (68 % und 95 % der Einzelwerte) für den dritten Tag nach Bestrahlung als Funktion der Dosis. Die untere Grenze des 95 %-Streubereiches un bestrahlter Kaninchen ($R_3(0)/S_f^{1,96}$) entspricht der oberen Grenze von Kaninchen ($R_3(5) \times S_f^{1,96}$), die mit ca. 5 Gy bestrahlt wurden (waagrechte gestrichelte Linie). Ein Kaninchen, bei dem drei Tage nach Bestrahlung dieser Retikulozytenwert gemessen wird, kann also eine Dosis zwischen $D = 0$ und ca. 5 Gy erhalten haben.

Mit der Abnahme der Retikulozytenwerte zu höheren Dosen nimmt die Streuung der Werte zu. Dies liegt zum Teil an der etwas größeren Meßunsicherheit bei kleineren Werten aber auch an dem etwas unterschiedlichen Verlauf der Retikulozytenwerte (individuell unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit) der einzelnen Versuchstiere.

An die Streufaktoren wurde ebenfalls eine Exponentialfunktion mit der Gleichung

$$S_f = 1,29 \times e^{0,047 D} \quad (\text{II.19})$$

angepaßt und die Streubereiche für die Irrtumswahrscheinlichkeiten $p_i = 0,33$ und $p_i = 0,05$ ($\bar{R}_3 \times S_f \pm 1$ bzw. $\bar{R}_3 \times S \pm 1,96$) berechnet.

Wenn nur der Retikulozytenwert am dritten Tag nach Bestrahlung bekannt ist, kann wegen der großen inter-individuellen Variation die Dosis nur sehr ungenau abgeschätzt werden. Wird von einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p_i = 0,05$ ausgegangen, entspricht die untere Grenze des Retikulozytenwertes der Kontrollen (waagrechte gestrichelte Linie) der oberen Grenze für Kaninchen, die mit einer Dosis von ca. $D = 4,3$ Gy bestrahlt worden sind. Ein Kaninchen, bei dem drei Tage nach Bestrahlung dieser Wert gemessen wird, kann also mit einer Wahrscheinlichkeit von $\rho = 0,95$ eine Dosis zwischen 0 und ca. 4,3 Gy erhalten haben. Der Grund für diese recht ungenaue Dosisabschätzung bei einem bestrahlten Einzeltier ist im wesentlichen die große inter-individuelle Variation des Retikulozytenwertes.

Relative Abnahme der Retikulozytenwerte R_3/R_0 am dritten Tag nach Bestrahlung in Abhängigkeit der Dosis

Wie oben dargelegt, ist es mit einer einzigen Messung des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung nicht möglich, eine Biologische Dosimetrie mit einer genügenden Genauigkeit durchzuführen. Der Grund für die erhebliche Unsicherheit einer Dosisabschätzung ist im wesentlichen die große inter-individuelle Variation des Retikulozytenwertes unbestrahlter Kaninchen. Eine genauere Dosisabschätzung ist daher nur zu erwarten, wenn der Retikulozytenwert eines Versuchstieres vor der Bestrahlung bekannt ist. Dann wird neben der individuellen Strahlenempfindlichkeit des jeweiligen Versuchstieres nur noch die intra-individuelle Variation des Retikulozytenwertes die Dosisabschätzung beeinflussen. Es soll deshalb im folgenden versucht werden, mit einer Messung der relativen Abnahme des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung eine Dosisabschätzung durchzuführen und ihre Genauigkeit abzuschätzen. Die relative Abnahme R_3/R_0 ist dabei das Verhältnis des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung (R_3) zum Wert vor Bestrahlung (R_0). Dieses Verhältnis wurde für

jedes einzelne Versuchstier bestimmt und der Median der relativen Abnahme der Retikulozytenwerte \widetilde{R}_3/R_0 für die jeweiligen Dosisgruppen berechnet.

Der Blutverlust durch die häufigen Blutentnahmen im Verlauf der Experimente führte zu einem geringfügigen Anstieg der Retikulozytenwerte bei den Kontrolltieren. Es ist daher anzunehmen, daß die Erythropoese in den überlebenden Stammzellen der bestrahlten Tiere im gleichen Maße erhöht sein wird. Bei Tieren, denen nach Bestrahlung kein Blut entnommen wird, sind daher entsprechend niedrigere Retikulozytenwerte zu erwarten.

Eine zusätzliche Stimulation der Erythropoese als Folge der Bestrahlung ist nicht zu erwarten, da die Sauerstoffversorgung des atmenden Gewebes wegen der langen Lebensdauer der Erythrozyten im Blut (100-120 Tage) noch einige Zeit gewährleistet ist. Dies trifft auch dann zu, wenn wegen einer vollständigen Zerstörung der Stammzellen im Knochenmark durch die Bestrahlung keine neuen Retikulozyten mehr gebildet werden sollten.

Die Ergebnisse für die relative Abnahme des Medians der Retikulozytenwerte am dritten Tag nach Bestrahlung wurden daher für den leichten Anstieg der Werte der Kontrolltiere korrigiert. Die Ergebnisse sind in Tab. II.7 zusammengefaßt.

Tab. II. 7 Median der relativen Abnahme der Retikulozytenwerte der einzelnen Versuchstiere für die Dosen 0,2,4 und 8 Gy. Die Daten wurden auf den durch die häufigen Blutentnahmen hervorgerufenen leichten Anstieg der Werte korrigiert.

D/Gy	\widetilde{R}_3/R_0	S _f
0	1,00	1,10
2	0,63	1,11
4	0,29	1,44
8	0,13	1,59

In Abb. II.24a ist der Median der relativen Abnahme des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung als Funktion der Dosis dargestellt.

An diese Daten wurde eine Exponentialfunktion mit der folgenden Gleichung angepaßt:

$$\widetilde{R}_3/R_0 = e^{-0,28 D} \quad (\text{II.20})$$

Abb. II.24b zeigt zusätzlich die Streufaktoren als Funktion der Dosis. Auch an die Streufaktoren wurde eine Exponentialfunktion mit der Gleichung

$$S_f = 1,10 \times e^{0,048 D} \quad (\text{II.21})$$

angepaßt und die Streubereiche für die Irrtumswahrscheinlichkeiten $p_i = 0,33$ und $p = 0,05$ berechnet.

Der Streufaktor des Medians der Änderungen der Retikulozytenwerte \widetilde{R}_3/R_0 der einzelnen Kontrolltiere beträgt $S_f = 1,10$. D. h. innerhalb von drei Tagen ändert sich mit einer Wahrscheinlichkeit von $p = 0,95$ der Retikulozytenwert bei unbestrahlten Kaninchen nicht mehr als um den Faktor $S_f^{1,96} = 1,10^{1,96} = 1,21$ (siehe Gl. II.8). Bei höheren Dosen nimmt die Streuung der relativen Abnahme des Retikulozytenwertes der einzelnen Kaninchen von $S_f = 1,1$ bei der Kontrolle bis auf $S_f = 1,6$ bei 8 Gy zu (Abb. II.24b). Der Grund für diese Zunahme bei den bestrahlten Tie-

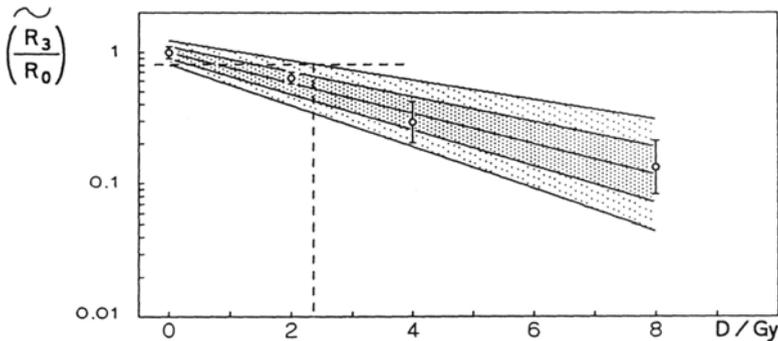


Abb. II.24a Median der relativen Abnahme der Retikulozytenwerte am dritten Tag nach Bestrahlung als Funktion der Dosis. Die untere Grenze des 95 %-Streubereiches unbestrahlter Kaninchen ($\widetilde{R}_3/R_0(0)/S_f$) entspricht der oberen Grenze von Kaninchen ($\widetilde{R}_3/R_0(2,3) \times S_f^{1,96}$), die mit ca. 2,3 Gy bestrahlt wurden (waagrechte gestrichelte Linie). Ein Kaninchen, bei dem drei Tage nach Bestrahlung dieser Retikulozytenwert gemessen wird, kann also eine Dosis zwischen 0 und ca. 2,3 Gy erhalten haben.

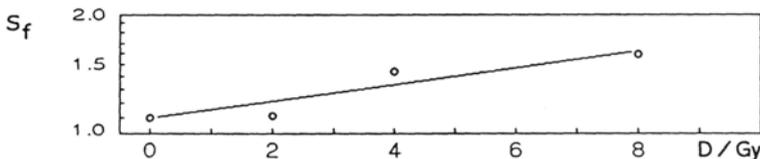


Abb. II.24b Streufaktor S_f des Medians der relativen Abnahme der Retikulozytenwerte \widetilde{R}_3/R_0 als Funktion der Dosis. Der Grund der Zunahme der Streuung ist offensichtlich durch die unterschiedliche individuelle Strahlenempfindlichkeit der einzelnen Versuchstiere bedingt.

ren liegt offensichtlich in einer individuell etwas unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeit der Tiere. Die Unsicherheit der relativen Abnahmen setzt sich aus dem Meßfehler und dem Median der intra-individuellen Variation des Retikulozytenwertes (beide sind dosisunabhängig) sowie der dosisabhängigen Variation der Strahlenempfindlichkeit zusammen. Die Meßfehler sind dabei gegenüber den beiden anderen Einflüssen zu vernachlässigen.

Die Wahrscheinlichkeit für eine relative Abnahme um mehr als 0,8 (waagerechte, gestrichelte Linie, Abb. II.24a) ist für die Kontrolltiere kleiner als $\rho = 0,025$. Ein Kaninchen, das mit einer unbekanntem Dosis bestrahlt wurde, und dessen Retikulozytenwert innerhalb von drei Tagen nach Bestrahlung um den Faktor 0,8 abnimmt, hat demnach mit einer Wahrscheinlichkeit von $\rho = 0,95$ eine Dosis zwischen 0 und ca. 2,3 Gy erhalten.

Durch Messungen des Retikulozytenwertes vor bzw. unmittelbar nach Bestrahlung (da sich der Retikulozytenwert dann noch nicht wesentlich geändert hat) und drei Tage nach Bestrahlung läßt sich für jedes bestrahlte Versuchstier eine um etwa den Faktor 2 genauere Dosisabschätzung vornehmen, als sie bei einer einmaligen Messung am dritten Tag nach Bestrahlung möglich ist. Die Genauigkeit einer solchen Biologischen Dosimetrie ist im wesentlichen nur noch von der intra-individuellen Variation des Retikulozytenwertes und der individuellen Strahlenempfindlichkeit des jeweiligen Versuchstieres begrenzt.

Retikulozytenwert bei Kaninchen nach einer Teilkörperbestrahlung

Vorbemerkung

Wird nur ein Teil des Knochenmarks bestrahlt, sollte die Wirkung auf den Organismus geringer sein als bei einer Ganzkörperbestrahlung. Möglicherweise wird das unbestrahlte, gesunde Knochenmark durch erhöhte erythropoetische Aktivität zumindest einen Teil des geschädigten Knochenmarks kompensieren. Entsprechend werden die zu beobachtenden Effekte geringer sein. Es ist deshalb zu klären, welche Wirkung eine Teilkörperbestrahlung auf die Gesamtleistung der Erythropoese ausübt. Untersuchungen der Retikulozytenwerte von anderen Arbeitsgruppen (Mathe et al. 1964, Rode et al., 1979, Glöbel, 1988) bei Patienten während einer Strahlentherapie mit bis zu 50 Gy Gesamtdosis zeigten allenfalls eine geringe Abnahme des Retikulozytenwertes. Systematische Untersuchungen stehen allerdings noch aus. Bei diesen Patienten wird immer nur ein Teil des Knochenmarks bestrahlt.

Verteilung des erythropoetisch aktiven Knochenmarks in den einzelnen Knochen des Kaninchens

Voraussetzung für die Bestrahlung von nur einem definierten Anteil des erythropoetisch aktiven Knochenmarks ist die Kenntnis der Verteilung des roten Knochenmarks im Skelett von Kaninchens. Vor Beginn der Teilkörperbestrahlungs-Experimente wurden deshalb die Anteile des erythropoetisch aktiven Knochenmarks in den einzelnen Knochen von 2 Versuchstieren festgelegt.

Zur Haemoglobin-Synthese bei der Blutbildung im roten Knochenmark wird Eisen benötigt. Durch Markierung mit radioaktivem Eisen und anschließender Messung der Aktivität in den einzelnen Knochen können die Anteile des roten Knochenmarks in den jeweiligen Knochen bestimmt werden.

Den Tieren wurde radioaktives Eisen in Form von ^{59}Fe -Citrat gebunden an autologem Blutplasma mit einer Aktivität von $1,85 \times 10^5 \text{Bq}$ in die Ohrvene injiziert. Nach 24 Stunden wurden die Tiere getötet. Die Knochen wurden präpariert und ihre Aktivität einzeln mit zwei gegenüberliegenden Szintillationsdetektoren mit je einem NaI (Tl)-Kristall (Größe: $8'' \times 4''$) und einem γ -Spektrometer gemessen. Die relativen Anteile $A_{\text{K}}/A_{\text{Ges}}$ der ^{59}Fe -Aktivität in den einzelnen Knochen eines Kaninchens sind in Abb. 11.25 angegeben. Sie entsprechen den Anteilen des roten Knochenmarks in den jeweiligen Knochen. Es zeigte sich, daß das erythropoetisch aktive Knochenmark bei beiden Tieren etwa zu gleichen Teilen auf die vordere und die hintere Körperhälfte verteilt ist.

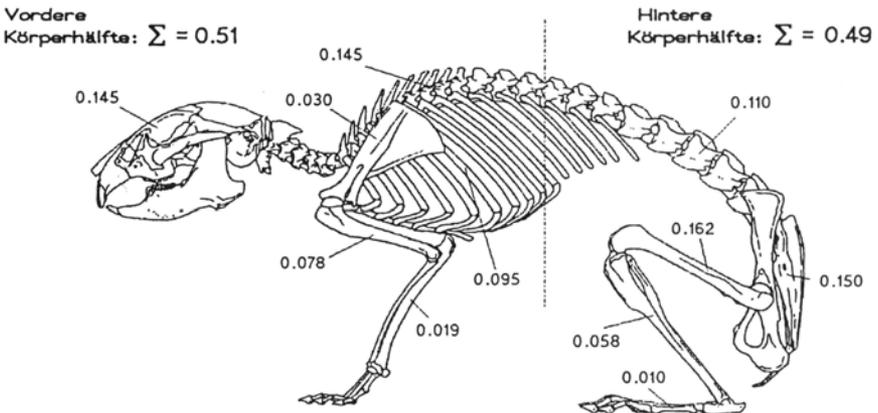


Abb. 11.25 Die Verteilung des erythropoetisch aktiven Knochenmarks wurde durch Einbau von radioaktivem Eisen (^{59}Fe -Citrat) und anschließender Messung der relativen Anteile $A_{\text{K}}/A_{\text{Ges}}$ der ^{59}Fe -Aktivität in den einzelnen Knochen von Kaninchen bestimmt. Dabei ergab sich, daß das erythropoetisch aktive Knochenmark etwa zu gleichen Teilen auf die vordere und hintere Körperhälfte verteilt ist. (Abbildung des Skeletts aus: Dawson, 1969).

Meßergebnisse der einzelnen Versuchstiere

Zur Untersuchung der Biologischen Wirkung einer Teilkörperbestrahlung wurde bei je 5 Kaninchen jeweils nur die vordere bzw. hintere Körperhälfte am Betatron mit der bereits auf S. 34 u. 35 beschriebenen Bestrahlungsanordnung mit einer Dosis von $D = 8$ Gy bestrahlt. Die andere Körperhälfte wurde mit Blei abgeschirmt.

In Abb. 11.26 sind die Retikulozytenwerte aller Versuchstiere als Funktion der Zeit nach Teilkörperbestrahlung dargestellt. Die Ergebnisse der Bestrahlung der vorderen bzw. hinteren Körperhälfte zeigen keine wesentlichen Unterschiede. Wie schon bei den Tieren nach Ganzkörperbestrahlung zu beobachten war, nimmt auch hier der Retikulozytenwert ab und erreicht etwa drei Tage nach der Teilkörperbestrahlung ein Minimum. Der Verlauf des Retikulozytenwertes eines Versuchstieres (Abb. II.26a - \blacklozenge -), weicht allerdings von den übrigen Kurven ab. Bei diesem Kaninchen nahm der Retikulozytenwert nach Bestrahlung nicht

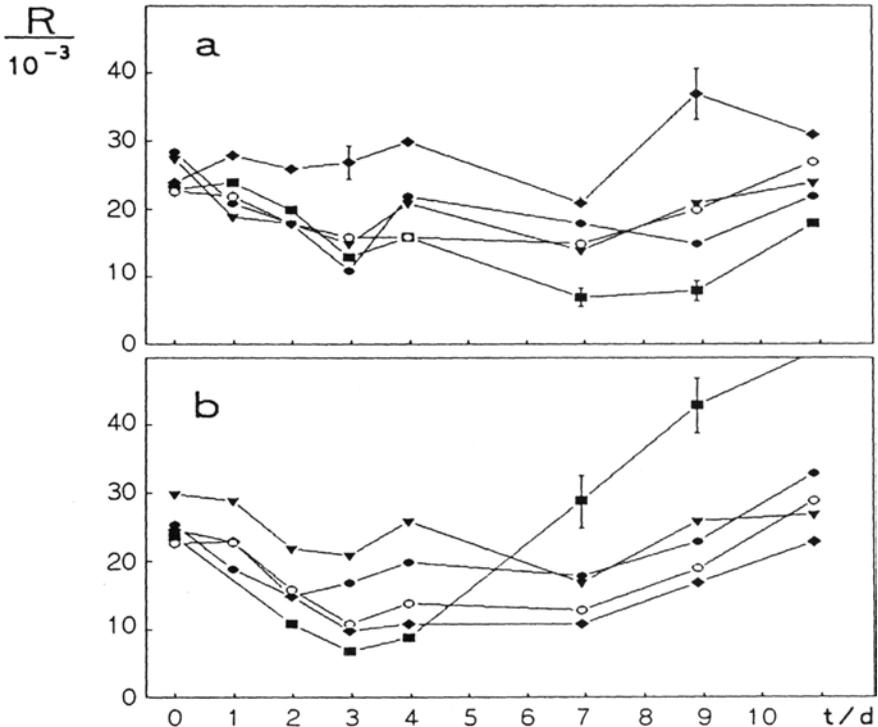


Abb. 11.26 Retikulozytenwerte als Funktion der Zeit nach Teilkörperbestrahlung mit $D = 8$ Gy. Bei jeweils 5 Kaninchen wurde die vordere (a) bzw. die hintere (b) Hälfte des Knochenmarks bestrahlt. Jedes Symbol stellt die Meßdaten eines Versuchstiers dar. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen mehrerer Einzelmessungen.

ab, sondern stieg sogar leicht an. Bis auf diese Ausnahme verlaufen die Kurven für die einzelnen Versuchstiere nahezu parallel.

Im Vergleich zur Ganzkörperbestrahlung ist jedoch die Abnahme des Retikulozytenwertes nach der Teilkörperbestrahlung trotz der hohen Dosis von 8 Gy deutlich geringer. Der Retikulozytenwert fällt bei den Kaninchen nur etwa auf die Hälfte des Ausgangswertes ab. Eine Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von nur etwa 2 Gy führte etwa zu der gleichen Abnahme des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung (Abb. 11.21).

Median R der Retikulozytenwerte sämtlicher Versuchstiere in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlung

Abb. 11.27 zeigt den Median R der Retikulozytenwerte als Funktion der Zeit nach Bestrahlung. Die Kurven für die Kaninchen, deren vordere bzw. hintere Körperhälfte bestrahlt wurde, zeigen keine wesentlichen

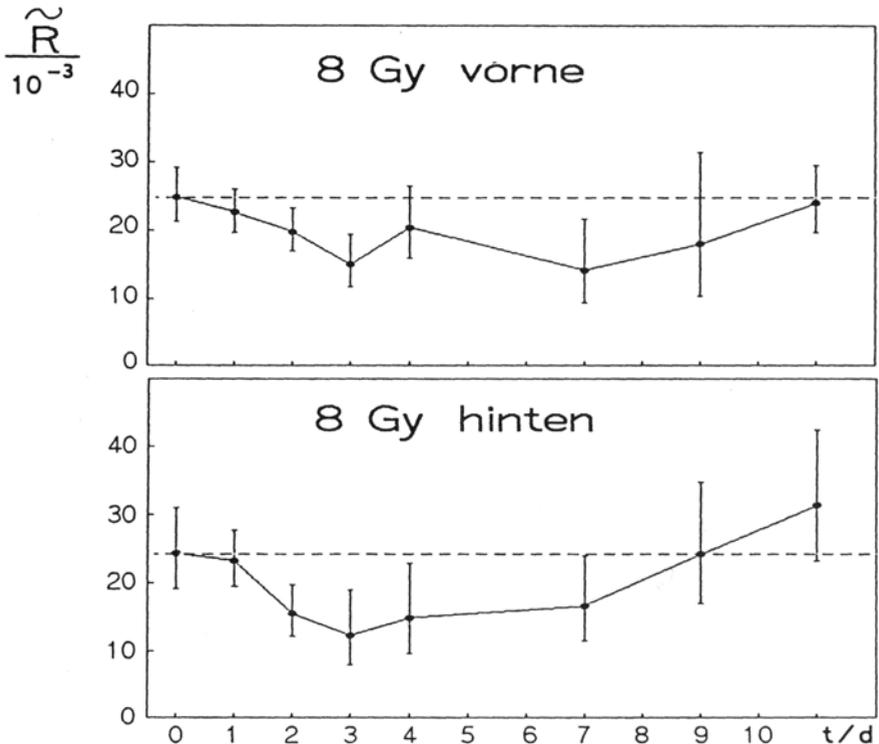


Abb. 11.27 Median der Retikulozytenwerte von Kaninchen als Funktion der Zeit nach Teilkörperbestrahlung mit $D = 8$ Gy. Bei jeweils 5 Kaninchen wurde die vordere bzw. hintere Hälfte des Knochenmarks bestrahlt. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Streuung für 68% der Werte.

Unterschiede. Der Retikulozytenwert nimmt bis zum Minimum am dritten Tag nach Bestrahlung etwa auf die Hälfte des Ausgangswertes ab. Das entspricht einer Abnahme des Retikulozytenwertes, wie sie nach einer Ganzkörperbestrahlung mit ca. 2 Gy zu erwarten ist.

Bei den Kaninchen, die eine Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy erhielten, stieg der Retikulozytenwert nach dem Minimum schnell wieder an und erreichte 5-6 Tage nach Bestrahlung wieder den Ausgangswert (Abb. 11.22). Nach der Teilkörperbestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy erhöhte sich dagegen der Retikulozytenwert nach dem Minimum nur sehr langsam. Der Ausgangswert wird erst ca. 10 Tage nach Bestrahlung wieder erreicht. Die gleiche Verzögerung wurde bei den Kaninchen beobachtet, die eine Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy erhielten.

Für den Median der relativen Abnahme des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung \bar{R}_3/\bar{R}_0 ergab sich $0,56 \times 1,22^{\pm 1}$ bei den Tieren, deren vordere Körperhälfte bestrahlt wurde, und $0,47 \times 1,27^{\pm 1}$ bei den Tieren, deren hintere Körperhälfte bestrahlt wurde. Auch bei der Berechnung dieser Ergebnisse wurde der geringfügige Anstieg der Retikulozytenwerte aufgrund der häufigen Blutentnahmen korrigiert.

Zum Verständnis dieser Ergebnisse soll folgendes Anschauungsbeispiel dienen: Die bestrahlte Hälfte des Knochenmarks sei bis auf wenige überlebende Zellen zerstört und kann daher nicht mehr zur Blutbildung beitragen. Die Bildung junger Retikulozyten von der unbestrahlten Hälfte des Knochenmarks geschieht weiterhin mit der gleichen Rate wie vor Bestrahlung. Wenn sich beide Kompartimente unabhängig voneinander verhalten, setzt sich der Verlauf des Retikulozytenwertes als Funktion der Zeit nach Bestrahlung zu gleichen Teilen aus der Retikulozytenbildung der bestrahlten und der unbestrahlten Hälfte zusammen. Bei dem bestrahlten Knochenmark wird der Retikulozytenwert jeweils im gleichen Verhältnis abnehmen wie nach einer Ganzkörperdosis von 8 Gy. Der Retikulozytenwert des unbestrahlten Knochenmarks bleibt konstant. Der Ausgangswert beider Kurven beträgt die Hälfte des Normalwertes. Die Addition beider Kurven ergibt den Verlauf des Retikulozytenwertes des gesamten Knochenmarks. Auch wenn vom bestrahlten Knochenmark zunächst keine Retikulozyten mehr gebildet werden, wird der Wert im Minimum am dritten Tag nach Bestrahlung nicht mehr als auf die Hälfte abfallen.

Abb. 11.28 zeigt einen solchen durch Addition zweier Kurven zusammengesetzten Verlauf des Retikulozytenwertes als Funktion der Zeit nach Bestrahlung einer Hälfte des Knochenmarks. Hierfür wurden die Daten der Kontrolltiere und die der Tiere nach einer Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy (Abb. 11.21) verwendet.

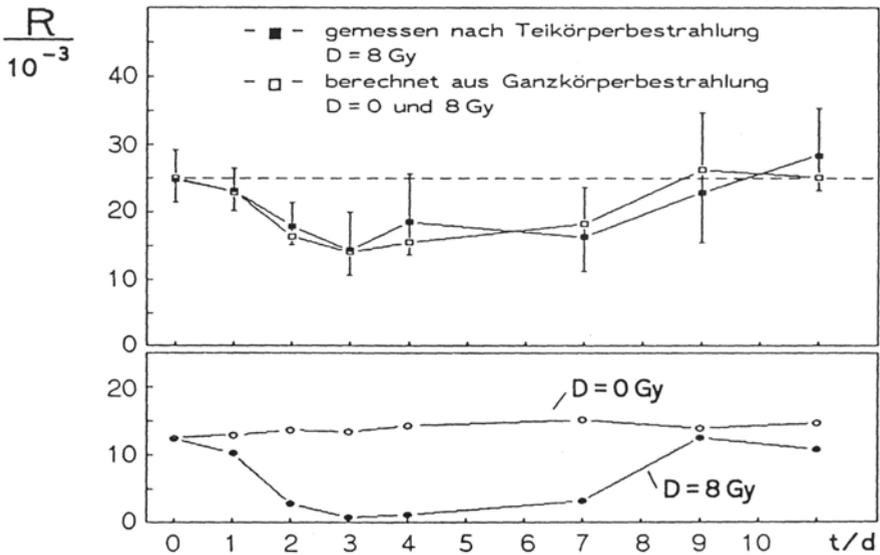


Abb. II.28 Verlauf des Retikulozytenwertes als Funktion der Zeit nach Teilkörperbestrahlung, bei der die Hälfte des Knochenmarks mit einer Dosis von 8 Gy bestrahlt wurde. Wenn sich beide Kompartimente unabhängig voneinander verhalten, setzt sich der Verlauf des Retikulozytenwertes zu gleichen Teilen aus der Retikulozytenbildung der unbestrahlten (—○—) und der bestrahlten (—●—) Hälfte zusammen (Daten der Kontrolltiere und der Tiere nach Ganzkörperbestrahlung mit 8 Gy, untere Grafik). Der Median der Retikulozytenwerte aller teilkörperbestrahlten Tiere (—■—) zeigt den gleichen zeitlichen Verlauf wie die Kurve (—□—), die aus der Addition der jeweiligen Werte der unteren Grafik gewonnen wurde.

Das Zeitintervall, in dem sich die wenigen überlebenden Zellen im bestrahlten Knochenmark soweit vermehrt haben, daß eine erneute Bildung von Retikulozyten im bestrahlten Knochenmark stattfindet, ist das gleiche, wie es bei den Tieren nach Ganzkörperbestrahlung beobachtet wurde. Der Ausgangswert wird nach Teilkörperbestrahlung daher ebenso wie nach Ganzkörperbestrahlung erst nach ca. 10 Tagen erreicht.

Der Median der Retikulozytenwerte aller teilkörperbestrahlten Kaninchen (Bestrahlung der vorderen und der hinteren Körperhälfte) zeigt innerhalb der Fehlergrenzen den gleichen zeitlichen Verlauf wie die durch Addition der Daten der Kontrolltiere und der Tiere nach Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von $D = 8$ Gy errechnete Kurve. Sowohl die relative Abnahme des Retikulozytenwertes als auch die Zeit bis zum Wiedererreichen des Ausgangswertes (ca. 10 Tage) bei dem gezeigten Anschauungsbeispiel entsprechen innerhalb der Meßgenauigkeit denen der experimentellen Ergebnisse. Eine erhöhte Erythropoese

aufgrund der Bestrahlung kann also zumindest für die ersten Tage nach Bestrahlung ausgeschlossen werden.

Altersverteilung von Retikulozyten nach Bestrahlung

Vorbemerkung

Die Untersuchungen und Analysen des vorhergehenden Abschnitts haben gezeigt, daß es mit einer oder mehreren Messungen des Retikulozytenwertes in Kaninchen als Funktion der Zeit nach einer Ganzkörperbestrahlung möglich ist, die Dosis mit einer Nachweisgrenze von etwa 4 Gy (bei einer Messung) bzw. etwa 2 Gy (bei zwei Messungen) abzuschätzen. Für eine Biologische Dosimetrie ist eine solche Genauigkeit möglicherweise ausreichend, es wäre jedoch wünschenswert, die Dosis noch genauer abschätzen zu können. Da dies durch Messung des Retikulozytenwertes wegen seiner inter- bzw. intra-individuellen Variation in den einzelnen Versuchstieren allein nicht möglich ist, wäre ein zusätzlicher und möglicherweise auch genauer meßbarer Parameter von großem Interesse. Es wäre z. B. denkbar, die Altersverteilung der Retikulozyten und ihre Veränderungen nach Bestrahlung zu analysieren. Da nach Inhibierung der Neubildung von Retikulozyten nach Bestrahlung des Knochenmarks zunächst der Anteil von jungen Retikulozyten im peripheren Blut absinkt, ist eine Verschiebung der Altersverteilung zu erwarten. Andererseits sollten nach Bildung von genügend neuen Stammzellen im Knochenmark mehrere Tage nach Bestrahlung viele junge Retikulozyten im peripheren Blut zu finden sein.

In diesem Zusammenhang könnte auch die Eisenaufnahme von Retikulozyten im Verlauf ihrer Reifung für eine genauere Biologische Dosisabschätzung von Interesse sein. Durch eine Messung der Eisenaufnahmerate in Retikulozyten lassen sich möglicherweise zusätzliche Informationen über die Altersverteilung der Retikulozyten und deren Veränderung nach Bestrahlung gewinnen.

Im folgenden Kapitel soll deswegen die Frage untersucht werden, ob durch eine Analyse der im Durchflußzytometer gemessenen Fluoreszenzverteilung von Retikulozyten Informationen über ihre Altersverteilung wie auch deren Änderung nach Bestrahlung gewonnen werden können.

Analyse der Fluoreszenzverteilungen von Retikulozyten nach AO-Färbung

Zur Untersuchung der Fluoreszenzverteilungen der Retikulozyten auf Änderungen ihrer Altersverteilung als Funktion der Zeit nach Bestrahlung wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet. Zunächst wurde für die einzelnen Verteilungen der Median F , d. h. die Kanalnummer bestimmt, die die Fläche der Verteilung in zwei Hälften teilt, so daß jeder Teil die Hälfte der gezählten Retikulozyten enthält (Abb. 11.29). Wegen der Inhibierung der Neubildung junger Retikulozyten nach Bestrahlung des Knochenmarks ist zunächst eine Verschiebung der Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten nach links und damit des Medians F zu kleineren Kanalnummern zu erwarten. Nach Vermehrung der überlebenden Stammzellen im Knochenmark werden wieder vermehrt junge Retikulozyten gebildet und ins periphere Blut ausgeschüttet. Diese jungen Retikulozyten zeigen eine hohe Fluoreszenz und werden deshalb in den Kanälen rechts in der Verteilung registriert. Der Median F der Fluoreszenzverteilung sollte sich daher wieder nach rechts zu höheren Kanalnummern hin verschieben.

Ein anderes Verfahren zur Untersuchung der Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten auf Änderungen ihrer Altersverteilung ist die Einteilung der Verteilung in Klassen. Die Verteilung kann in zwei oder mehr Klassen eingeteilt werden, so daß jede Klasse die Retikulozyten eines bestimmten Fluoreszenz- bzw. Altersintervalls repräsentiert (Abb. 11.29 und 11.33). Informationen über die Altersverteilung der Retikulozyten und ihrer Änderungen nach Bestrahlung müßten dann durch Bestimmung der Anteile der Retikulozyten in den einzelnen Klassen zu erhalten sein. Es ist zu erwarten, daß der Anteil in den Klassen von Retikulozyten mit hoher Fluoreszenz nach Bestrahlung zunächst abnimmt, während der Anteil der Retikulozyten mit niedriger Fluoreszenz gleichzeitig ansteigt. Ein erneutes Auftreten junger Retikulozyten einige Tage nach Bestrahlung müßte durch einen Anstieg des Anteils der Retikulozyten mit hoher Fluoreszenz (junge Retikulozyten) zu erkennen sein. Es ist dabei vorausgesetzt, daß die gemessene Fluoreszenzintensität der Retikulozyten mit zunehmendem Reifungsgrad abnimmt.

Abhängigkeit des Medians der Fluoreszenzverteilung von der Zeit nach Bestrahlung

Abb. 11.29 zeigt einige Beispiele für Fluoreszenzverteilungen der Retikulozyten im peripheren Blut von Kaninchen zu verschiedenen Zeiten nach Ganzkörperbestrahlung mit $D = 8$ Gy. Die Erythrozyten N_{Ery} wurden in Kanal 0 registriert. Die Verteilungen sind auf die gleiche Anzahl Erythrozyten $N_{\text{Ery}} = 10^4$ normiert.

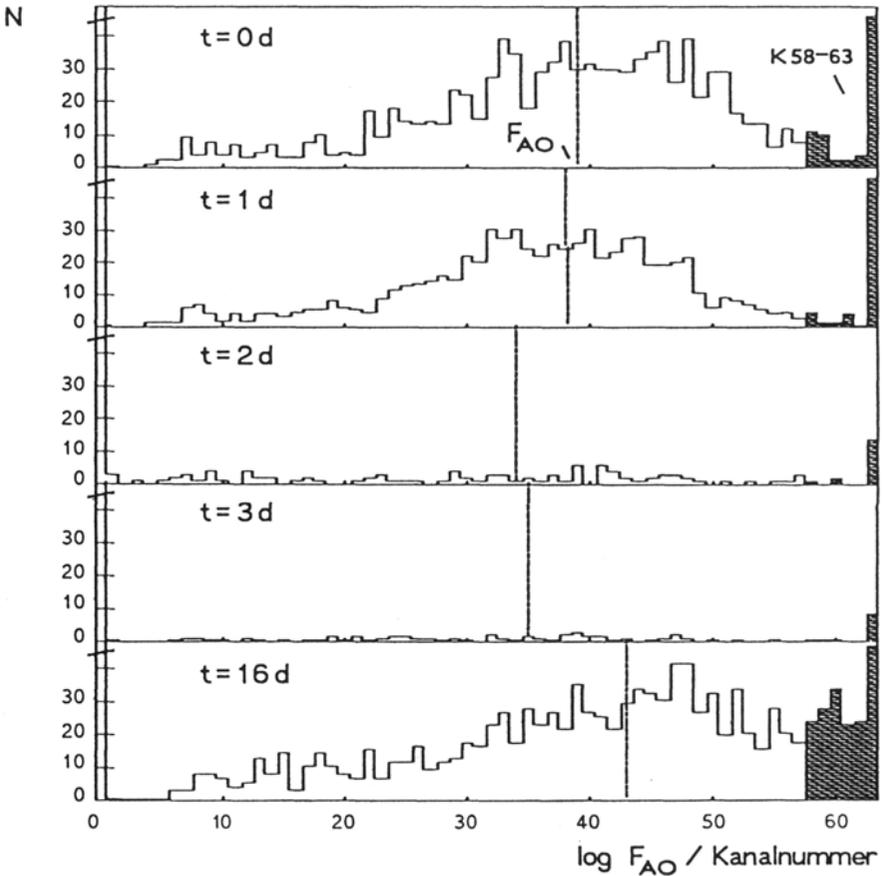


Abb. II.29 Fluoreszenzverteilungen der Retikulozyten im peripheren Blut von Kaninchen zu verschiedenen Zeiten nach Ganzkörperbestrahlung mit $D = 8$ Gy. Die Erythrozyten wurden in Kanal 0 registriert. Die Histogramme sind auf die gleiche Anzahl von Erythrozyten $N_{\text{Ery}} = 10^4$ normiert. Für die einzelnen Verteilungen wurde jeweils der Median \bar{F} und der relative Anteil der jungen Retikulozyten in den Kanälen 58–63, $N_{\text{Ret}}(\text{K } 58-63) / N_{\text{Ret}}$ bestimmt. Diese Werte sind in Abb. II.30 (\bar{F}) und II.32 [$N_{\text{Ret}}(\text{K } 58-63) / N_{\text{Ret}}$] als Funktion der Zeit nach Bestrahlung dargestellt.

Für alle Verteilungen wurde jeweils der Median F_{AO} berechnet. Während die Fläche der Verteilung (Zahl der Retikulozyten) abnimmt, verschiebt sich der Median F_{AO} zunächst nach links. Am zweiten Tag nach Bestrahlung liegt er am weitesten links, danach verschiebt er sich wieder nach rechts. Nachdem sich die überlebenden Stammzellen ausreichend vermehrt haben und wieder junge Retikulozyten in großer Zahl ins periphere Blut geschwemmt werden, verschiebt sich der Median F_{AO} der Verteilung weiter nach rechts über den Ausgangswert hinaus ($t = 16$ d).

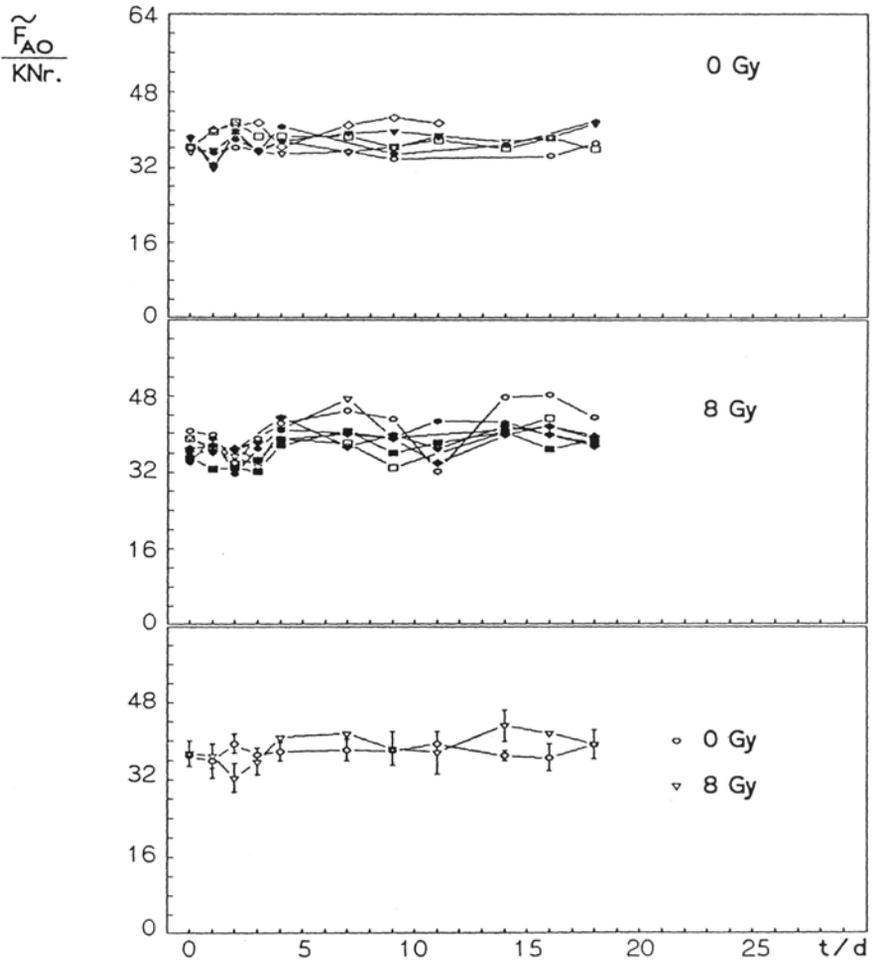


Abb. 11.30 Median der Fluoreszenzverteilungen F_{AO} der Retikulozyten im peripheren Blut der ganzkörperbestrahlten Kaninchen ($D = 8 \text{ Gy}$) und der Kontrolltiere als Funktion der Zeit nach Bestrahlung. Oben: Einzelverläufe der Kontrolltiere. Mitte: Einzelverläufe der Tiere nach Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von $D = 8 \text{ Gy}$. Unten: Verlauf der Mittelwerte beider Gruppen. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen der Einzelwerte.

Die Einzelverläufe der bestrahlten Kaninchen unterscheiden sich von denen der Kontrolltiere nur geringfügig. Während sich der Median F_{AO} der Verteilungen bei den Kontrolltieren innerhalb der Fehlergrenzen nicht signifikant ändert, nimmt er bei den bestrahlten Kaninchen zunächst leicht ab, d. h. die Verteilungen verschieben sich nach der Bestrahlung nach links. Nach einem Minimum am zweiten Tag nach Bestrahlung nimmt der Median der Verteilungen wieder zu und erreicht etwa zum Zeitpunkt $t = 4$ wieder den Ausgangswert.

Die Ergebnisse für die Kontrolltiere und für die Kaninchen nach Ganzkörperbestrahlung mit $D = 8$ Gy sind in Abb. 11.30 als Funktion der Zeit nach Bestrahlung dargestellt. Die beiden oberen Grafiken zeigen die Einzelverläufe der Versuchstiere beider Gruppen, die untere Grafik zeigt den Verlauf der jeweiligen Mittelwerte. Bei den Kontrolltieren war innerhalb der Fehlergrenzen keine signifikante Verschiebung des Medians F_{AO} der Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten zu beobachten. Bei den bestrahlten Kaninchen dagegen nahm der Median F_{AO} der Fluoreszenzverteilung nach Bestrahlung zunächst leicht ab, d.h. die Verteilungen verschoben sich geringfügig nach links. Nach Erreichen eines Minimums am zweiten Tag nach Bestrahlung bewegte sich der Median F_{AO} der Verteilungen wieder nach rechts zu höheren Kanalnummern. Nach ca. vier Tagen war wieder der Ausgangswert erreicht. Der Median F_{AO} der Verteilung verschob sich bei den mit $D = 8$ Gy bestrahlten Kaninchen im Mittel jedoch nur um ca. 5-6 Kanäle (bei $t = 2$ d) nach links. Trotz der hohen Ganzkörperdosis von $D = 8$ Gy war der beobachtete Effekt nur sehr gering. Bei den Dosen $D = 2$ Gy und 4 Gy konnten keine signifikanten Veränderungen der Fluoreszenzverteilungen der Retikulozyten beobachtet werden. Auf die Darstellung dieser Ergebnisse wird deshalb verzichtet.

Wie die Ergebnisse in Abb. 11.30 zeigen, sind die gemessenen Verschiebungen der Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten als Funktion der Zeit nach Bestrahlung erheblich geringer als erwartet. Der Grund dafür liegt vermutlich darin, daß die Fluoreszenzverteilungen einen bestimmten Anteil Untergrund enthalten. Dieser Untergrund kann z. B. durch unspezifisch angefärbte Partikel, Fluoreszenz der Farblösung, Zellbruchstücke oder Rauschen der Elektronik hervorgerufen werden.

Interpretation der Daten mit Hilfe eines einfachen Modells

Der Einfluß des Untergrundes auf die Verschiebung der Fluoreszenzverteilung soll an folgendem Anschauungsmodell genauer erläutert werden (Abb. 11.31). Es sei eine vereinfachte Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten angenommen, wobei in den einzelnen Kanälen jeweils die gleiche Anzahl Retikulozyten gezählt wird. Vor Bestrahlung befindet sich die Altersverteilung der Retikulozyten in einem Fließ-Gleichgewicht. In der Verteilung erscheint von rechts jeweils die gleiche Anzahl junger Retikulozyten, wie ausgereifte Retikulozyten nach links aus ihr herauslaufen. Nach der Bestrahlung des Knochenmarks werden keine neuen Retikulozyten mehr gebildet; die Reifung der Retikulozyten im Blut bleibt davon jedoch unbeeinflusst. Es laufen deshalb keine jungen Retikulozyten von rechts in die Verteilung, während die übrigen weiterhin reifen und nach links wandern. In dem Beispiel wird ein konstanter Untergrund von $N_{Ug} = 5$ bei der Messung angenommen. Die Verteilun-

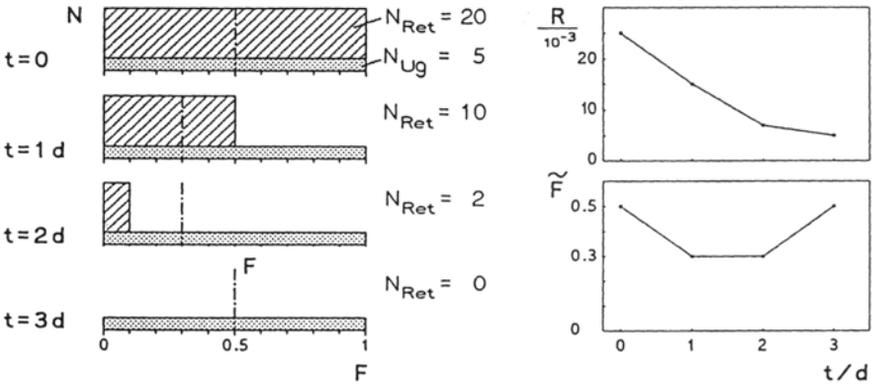


Abb. 11.31 Anschauungsmodell zur Verschiebung der Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten nach Bestrahlung. Bis zum Zeitpunkt $t = 0$ befindet sich die Alters Verteilung der Retikulozyten in einem Fließ-Gleichgewicht. In der Verteilung erscheint von rechts jeweils die gleiche Anzahl junger Retikulozyten wie ausgereifte Retikulozyten nach links aus ihr herauslaufen. Nach der Bestrahlung des Knochenmarks werden keine neuen Retikulozyten mehr gebildet; die Reifung der Retikulozyten im Blut bleibt davon jedoch unbeeinflusst. Der Zufluß junger Retikulozyten von rechts ist daher unterbrochen, während die übrigen weiterhin reifen und nach links wandern. In dem Beispiel wird ein konstanter Untergrund von $N_{Ug} = 5$ bei der Messung angenommen. Die Verteilungen sind auf eine Erythrozytenzahl von $N_{Ery} = 1000$ normiert.

Die Abbildungen auf der rechten Seite zeigen die mit diesem Modell berechneten Retikulozytenwerte R und den Median F als Funktion der Zeit nach Bestrahlung.

Bei $t = 0$ werden $N_{Ret} = 20$ Retikulozyten gezählt. Der Meßwert beträgt dann $(N_{Ug} + N_{Ret})/N_{Ery} = 25 \times 10^{-3}$. Der Median F der Verteilung in der Mittel ($F = 0,5$).

Nach $t = 1$ d hat die Zahl der Retikulozyten auf $N_{Ret} = 15$ abgenommen und sich ihre Fluoreszenzverteilung nach links verschoben. Der Untergrund N_{Ug} bleibt weiterhin konstant. Der Median der Fluoreszenzverteilung von Untergrund und Retikulozyten hat sich nach $F = 0,3$ verschoben.

Nach $t = 2$ d sind die Retikulozyten weiter gereift, ihre Anzahl hat weiter auf $N_{Ret} = 2$ abgenommen, und ihre Fluoreszenzverteilung liegt noch weiter links. Der Median der Verteilung von Untergrund und Retikulozyten bleibt jedoch bei $F = 0,3$.

Nach $t = 3$ d schließlich sind keine Retikulozyten mehr vorhanden. Der Median des Histogramms, das jetzt nur noch aus der konstanten Verteilung des Untergrunds besteht liegt wieder bei $F = 0,5$.

gen sind auf eine Erythrozytenzahl von $N_{Ery} = 1000$ normiert. Bei $t = 0$ werden $N_{Ret} = 20$ Retikulozyten gezählt. Der Meßwert beträgt dann $(N_{Ug} + N_{Ret})/N_{Ery} = 25 \times 10^{-3}$. Der Median F der Verteilung liegt in der Mitte ($F = 0,5$). Nach $t = 1$ d hat die Zahl der Retikulozyten auf $N_{Ret} = 15$ abgenommen, gleichzeitig hat sich ihre Fluoreszenzverteilung nach links bewegt. Der Untergrund N_{Ug} soll weiterhin konstant bleiben. Der Median der Fluoreszenzverteilung von Untergrund und Retikulozyten hat sich daher mit $F = 0,3$ nach links verschoben. Nach $t = 2$ d sind

die Retikulozyten weiter gereift, ihre Anzahl hat weiter auf $N_{\text{Ret}} = 2$ abgenommen, ihre Fluoreszenzverteilung hat sich noch nach weiter links verschoben. Der Median der Verteilung von Untergrund und Retikulozyten bleibt jedoch $F = 0,3$. Nach $t = 3$ d schließlich sind keine Retikulozyten mehr vorhanden. Der Median der Verteilung, die jetzt nur noch aus dem konstanten Untergrund besteht, liegt wieder bei $F = 0,5$.

Die gemessenen Fluoreszenzverteilungen sind immer eine Überlagerung der Verteilung der Retikulozyten und der Verteilung des Untergrundes. Das Beispiel zeigt deutlich, daß die Fluoreszenzverteilung und damit der Median F mit abnehmendem Retikulozytenwert zunehmend durch den Untergrund beeinflusst wird. Je geringer der Retikulozytenwert der Probe ist, um so mehr wird die gemessene Verteilung von der Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten abweichen.

Mit diesem einfachen Modell läßt sich verstehen, daß der Median F der Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten bei den Daten der Abb. 11.30 als Funktion der Zeit nach Bestrahlung nur geringfügig abnimmt. Wahrscheinlich tritt bei der Messung mit der AO-Färbung ein erheblicher Untergrund auf, der insbesondere bei sehr niedrigen Retikulozytenwerten einige Tage nach Bestrahlung die Verteilung dominiert. Wesentlich bessere Ergebnisse lassen sich mit der TO-Färbung erreichen.

Änderung der Anteile von Retikulozyten in verschiedenen Altersklassen

In den gemessenen Fluoreszenzverteilungen wurden zusätzlich die Anteile von jungen Retikulozyten als Funktion der Zeit nach Bestrahlung untersucht. Dazu wurde jeweils der relative Anteil der gezählten Retikulozyten in den rechten sechs Kanälen: $N_{\text{Ret}}(K58-K63)/N_{\text{Ret}}$ bestimmt (siehe Abb. 11.29). Der zeitliche Verlauf dieses Anteils junger Retikulozyten im Blut der mit $D = 8$ Gy ganzkörperbestrahlten Kaninchen und der Kontrolltiere ist in Abb. 11.32 dargestellt. Die beiden oberen Grafiken zeigen die Einzelverläufe der Tiere der beiden Gruppen, die untere den Verlauf der jeweiligen Mittelwerte. Die Daten der Kontrolltiere zeigen bereits eine große Streuung. Innerhalb der Fehlergrenzen blieb der Anteil der in den letzten sechs Kanälen gezählten Retikulozyten konstant. Bei den bestrahlten Kaninchen nahm die Streuung der Werte nach Bestrahlung noch erheblich zu. Die Mittelwerte dieser Gruppe stiegen an und lagen drei Tage nach Bestrahlung deutlich über den Werten der Kontrolltiere. Nach einem Maximum am vierten Tag nach Bestrahlung fiel der Wert wieder ab und erreichte nach ca. 9 Tagen wieder den Ausgangswert.

Nach Bestrahlung wäre zunächst ein Abfallen des relativen Anteils junger Retikulozyten zu erwarten gewesen. Erst nachdem sich die überle-

benden Stammzellen genügend vermehrt haben, sollten wieder junge Retikulozyten ins periphere Blut ausgeschwemmt werden. Dies hätte nach ca. 10 Tagen einen Anstieg des relativen Anteils junger Retikulozyten zur Folge. Die gemessene Kurve zeigt jedoch genau einen entgegengesetzten Verlauf. Auch hier ist die Ursache der Untergrund bei der Messung. Während der Anteil der Retikulozyten abfällt, überwiegt zunehmend der Anteil des Untergrundes. Am dritten Tag nach Bestrahlung, wo der Retikulozytenwert ein Minimum durchläuft, erreicht der relative Anteil der in den letzten sechs Kanälen gemessenen Zellen ein Maximum. Während der Retikulozytenwert wieder zunimmt, sinkt auch der relative Anteil der in den rechten Kanälen gemessenen Partikel. Nach ca. 10 Tagen erreichen beide Kurven wieder den Ausgangswert.

Die Zunahme der Streuung der Werte bei den Kaninchen nach Bestrahlung (Abb. 11.32, Mitte) läßt sich möglicherweise durch ein vermehrtes Auftreten von Zellbruchstücken im Blut erklären.

Diese Ergebnisse zeigen, daß mit der Färbung der Retikulozyten mit der AO-Technik eine Messung des Retikulozytenwertes möglich ist. Bei sehr geringen Retikulozytenwerten, wie sie nach Bestrahlung mit hohen Dosen gemessen werden, ist jedoch mit einem erheblichen Untergrundanteil zu rechnen, der sich der Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten überlagert. Es ist deshalb mit dieser Methode nicht möglich, Informationen über die Altersverteilung und ihre Veränderung nach Bestrahlung aus den gemessenen Fluoreszenzverteilungen zu gewinnen.

Analyse der Fluoreszenzverteilungen vom Retikulozyten nach TO-Färbung

Die Färbung der Retikulozyten mit dem speziell zu diesem Zweck entwickelten Fluoreszenzfarbstoff Thiazolorange (TO) besitzt erhebliche Vorteile gegenüber der Färbung mit Acridin Orange (AO), so daß Messungen von Fluoreszenzverteilungen mit geringerem Untergrund möglich sind. Dieser Farbstoff stand jedoch erst nach Beendigung der Tierexperimente zur Verfügung. Ein zusätzliches Experiment an einem weiteren Kaninchen sollte deshalb klären, ob es mit dieser neuen Methode prinzipiell möglich ist, Veränderungen der Altersverteilung nach Bestrahlung zu messen. Zu diesen Messungen wurde außerdem ein neuer Meßverstärker benutzt, der einen Meßbereich von mehr als 3 Dekaden besitzt. Dieser Verstärker, der ebenfalls erst nach Beendigung der Tierexperimente zur Verfügung stand, ermöglichte die gleichzeitige Messung der Fluoreszenzverteilungen von Erythrozyten und Retikulozyten. Auf eine Kalibrierung der Verstärkung konnte daher verzichtet werden, wodurch Fehlerquellen wie Zeitabhängigkeit der Färbung,

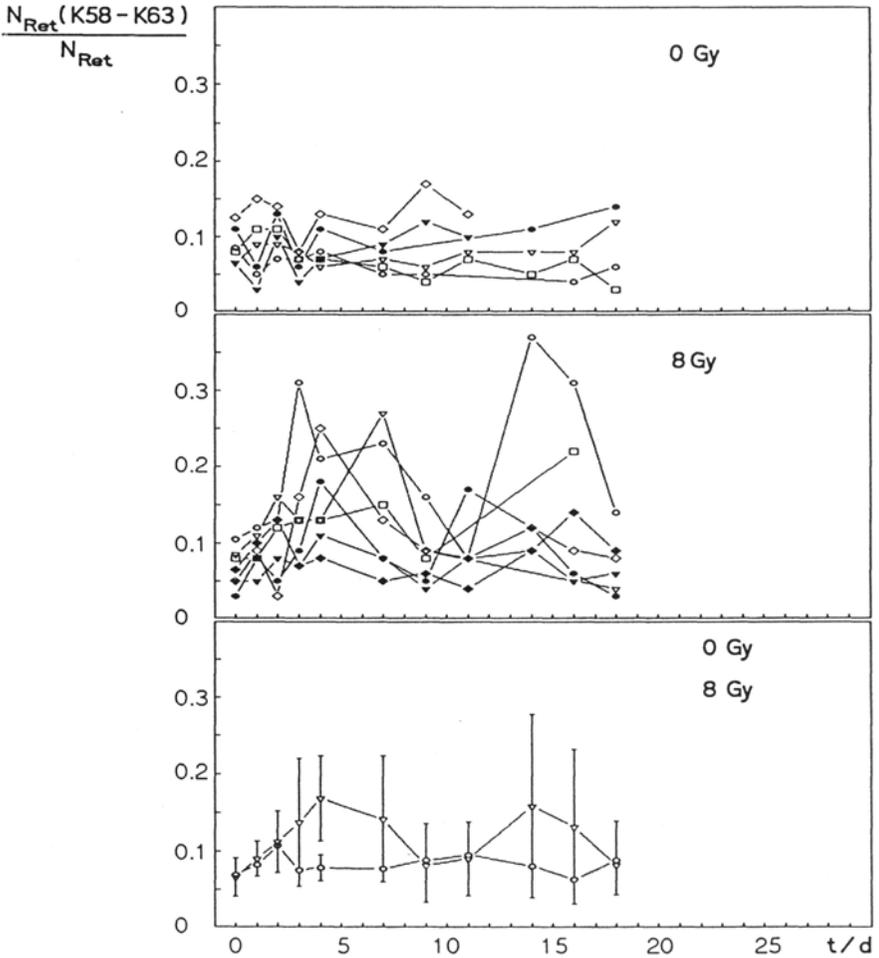


Abb. 11.32 Relative Anteile junger Retikulozyten im peripheren Blut von Kaninchen als Funktion der Zeit nach Bestrahlung. Es wurde jeweils der relative Anteil der gezählten Retikulozyten in den letzten sechs Kanälen, $N_{Ret} (K 58-K 63) / N_{Ret}$ bestimmt. Oben: Einzelverläufe der Kontrolltiere. Mitte: Einzelverläufe der Tiere nach Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von $D = 8 \text{ Gy}$. Unten: Verlauf der Mittelwerte beider Gruppen.

Ausbleichen der gefärbten Probe sowie ein Drift der Verstärkerelektronik ausgeschlossen werden konnten.

Es wurde ein weiteres Kaninchen am Betatron mit einer Ganzkörperdosis von $D = 8 \text{ Gy}$ bestrahlt. Der Versuchsablauf war der gleiche wie bei den vorangegangenen Tierexperimenten. In einem Zeitraum von einer Woche vor Bestrahlung bis vier Wochen nach Bestrahlung wurden wöchentlich drei Blutproben entnommen. Nur in der ersten Woche nach

Bestrahlung wurde täglich eine Blutprobe entnommen. Die Retikulozyten wurden nach der bereits beschriebenen Methode angefärbt. Dabei wurden bei jeder Blutentnahme jeweils 3 Proben angesetzt, jede Probe wurde zudem zweimal gemessen.

Abb. 11.33 zeigt einige Fluoreszenzverteilungen von Erythrozyten und Retikulozyten im peripheren Blut des Kaninchens zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung. Die Histogramme sind auf die gleiche Anzahl von Erythrozyten N_{Ery} normiert. Außerdem wurden die Abszissen der

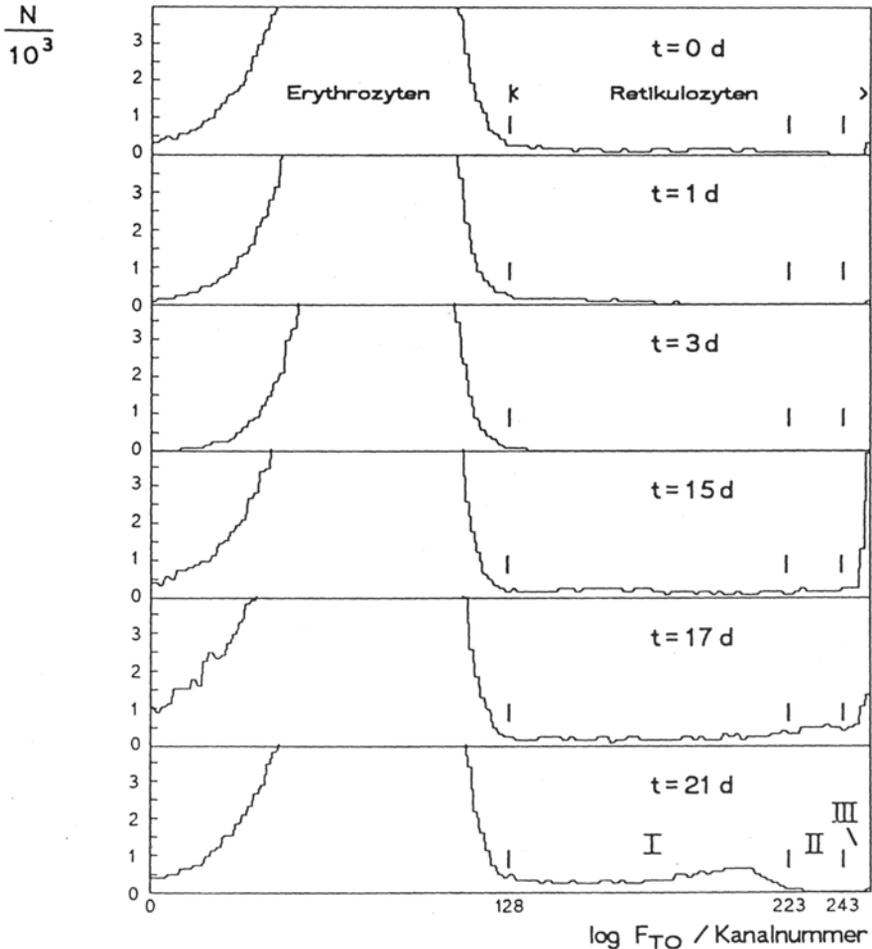
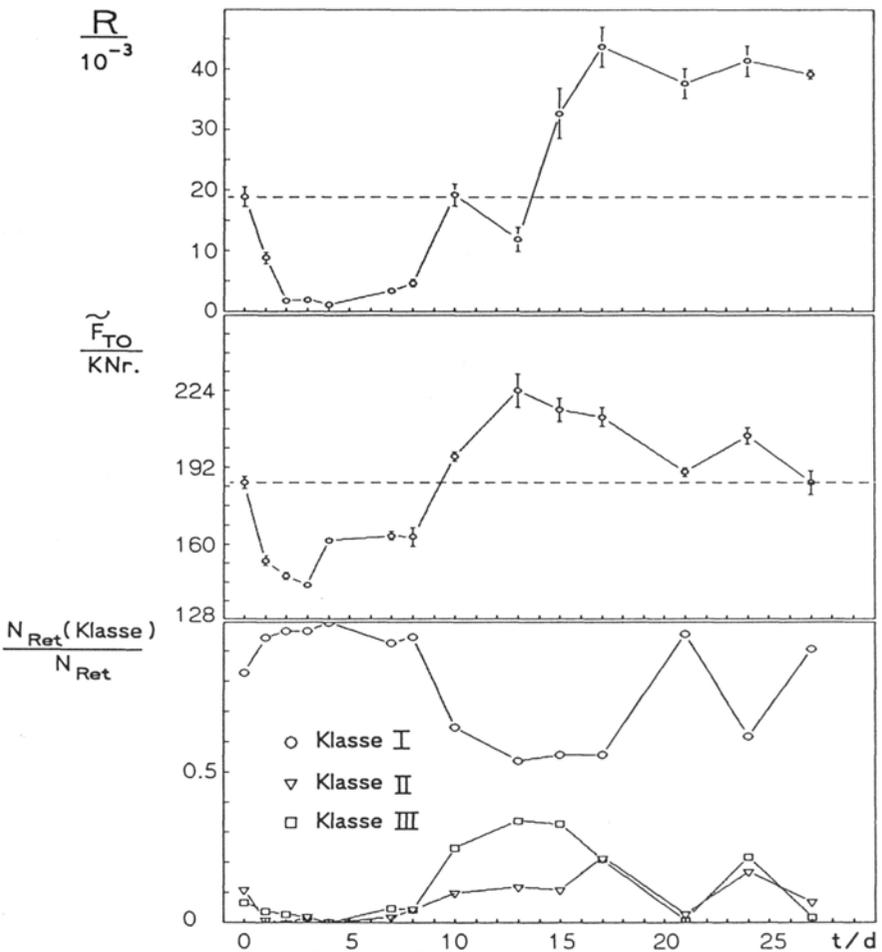


Abb. 11.33 Fluoreszenzverteilungen von Erythrozyten und Retikulozyten eines mit $D = 8$ Gy ganzkörperbestrahlten Kaninchens zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung. Die Verteilung der Retikulozyten wurde in drei Klassen eingeteilt, so daß sich für alle Klassen jeweils gleiche Intervalle für die Fluoreszenzintensität ergeben.

Histogramme so normiert, daß die Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten zwischen Kanal 128 und Kanal 255 lag. Der zugehörige zeitliche Verlauf des Retikulozytenwertes ist in Abb. 11.34 (obere Grafik) dargestellt.

Vor Bestrahlung ($t = 0$) zeigen die Retikulozyten eine breite Verteilung, die links in die Autofluoreszenz der Erythrozyten übergeht und rechts, etwa bei Kanal 240, flach ausläuft. Nach Bestrahlung werden keine jungen Retikulozyten mehr gebildet. Die Reifung der Retikulozyten läuft aber weiter, so daß sich ihre Fluoreszenzverteilung zum Zeitpunkt $t = 1$ d bereits deutlich nach links verschoben hat. Nach zwei bis drei Tagen waren die Retikulozyten vollständig ausgereift, so daß rechts von der Verteilung der Erythrozyten fast keine Zellen mehr gemessen wur-



den ($t = 3$ d). Zwischen 10 und 17 Tagen nach Bestrahlung stieg der Retikulozytenwert wieder steil an (Abb. 11.34 oben). Während dieses Zeitintervalls wurden zunehmend junge Retikulozyten am rechten Ende der Verteilung gemessen. Diese Zellen zeigten eine wesentlich höhere Fluoreszenzintensität als die jungen Retikulozyten, die vor der Bestrahlung gemessen wurden. Vermutlich handelt es sich dabei um Retikulozyten, die in früheren Reifungsstufen vom Knochenmark ins Blut ausgeschwemmt werden. Danach wird der Anteil der jungen Retikulozyten mit erhöhter Fluoreszenzintensität wieder geringer. Zum Zeitpunkt $t = 21$ Tage liegt das rechte Ende der Verteilung etwa wieder an der gleichen Stelle wie bei den Histogrammen vor Bestrahlung, d. h. die jüngsten ins Blut ausgeschwemmten Retikulozyten zeigen wieder die gleiche Fluoreszenzintensität wie vor der Bestrahlung.

Abhängigkeit des Medians der Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten von der Zeit nach Bestrahlung

Zunächst wurden alle Histogramme so normiert, daß die Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten jeweils zwischen den Kanälen 128 und 255 lag. Die Inhalte der Kanäle 0-127 wurden auf 0 gesetzt. Dann wurden die jeweiligen Mediane F_{TO} dieser normierten Verteilungen bestimmt, d. h. es wurde jeweils diejenige Kanalnummer gesucht, die die Fläche der Verteilung in zwei Hälften teilt. Die Werte für die insgesamt 18 Messungen vor Bestrahlung wurden gemittelt, ebenso die Werte der jeweils

4

Abb. 11.34 Oben: Retikulozytenwert eines Kaninchens als Funktion der Zeit nach Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von $D = 8$ Gy. Dieser mit der TO-Färbung gemessene Verlauf entspricht den Ergebnissen, die mit der AO-Färbung gewonnen wurden.

Mitte: Zeitlicher Verlauf des Medians F_{TO} der Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten im peripheren Blut des selben Kaninchens nach Bestrahlung. Die Fluoreszenzverteilungen der Retikulozyten verschieben sich nach Bestrahlung zunächst nach links. Nach ca. drei Tagen erreicht der Median der Fluoreszenzverteilungen ein Minimum. Danach werden zunehmend junge Retikulozyten gebildet, die eine sehr hohe Fluoreszenzintensität zeigen und deshalb in den Kanälen rechts registriert werden (siehe auch Abb. 11.33). Der Median F_{TO} der Verteilungen verschiebt sich daher wieder nach rechts zu höheren Kanalnummern, erreicht etwa 10 Tage nach Bestrahlung wieder den Ausgangswert und steigt dann noch weit über diesen hinaus an.

Unten: Relative Anteile der Retikulozyten in drei verschiedenen Altersklassen (siehe Abb. 11.33, Klasse I, II, III). Die Einteilung wurde so gewählt, daß sich jeweils gleiche Intervalle für die Fluoreszenzintensität der Retikulozyten ergeben. Während die Anteile der jungen Retikulozyten (II und III) nach Bestrahlung abnehmen, steigt der relative Anteil der älteren Retikulozyten zunächst noch etwas an und erreicht nach 3-4 Tagen den Wert 1.

6 Messungen jeder Blutentnahme nach Bestrahlung. Der Median der Verteilungen lag vor Bestrahlung bei $F_{TO} = 186 \pm 3$, also etwa in der Mitte zwischen den Kanälen 128 und 255 (die Mitte liegt bei Kanal 192). Der zeitliche Verlauf des Medians F_{TO} nach Bestrahlung ist in Abb. 11.34 (mittlere Grafik) dargestellt. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen der jeweiligen Mittelwerte der Messungen. Wie schon aus den Histogrammen in Abb. 11.33 zu erkennen war, verschiebt sich der Median F_{TO} der Verteilung nach Bestrahlung zunächst nach links und erreicht ca. drei Tage nach Bestrahlung ein Minimum. Danach werden wieder zunehmend junge Retikulozyten gebildet, die eine sehr hohe Fluoreszenzintensität zeigen und deshalb in den Kanälen rechts registriert werden. Der Median F_{TO} verschiebt sich daher wieder nach rechts zu höheren Kanalnummern. Nach etwa 10 Tagen liegt er wieder in der Mitte und wandert weiter nach rechts, bis er etwa am 13. Tag nach Bestrahlung ein Maximum erreicht. In diesem Zeitintervall steigt auch der Retikulozytenwert R (Abb. 11.34, obere Grafik) wieder steil bis weit über den Ausgangswert hinaus an. Danach wird der Anteil der jungen Retikulozyten mit erhöhter Fluoreszenzintensität wieder geringer und das rechte Ende der Verteilung bewegt sich wieder nach links (Abb. 11.33). Damit wandert auch der Median F_{TO} der Verteilung nach links und nähert sich 3-4 Wochen nach Bestrahlung wieder dem Ausgangswert.

Änderung der Anteile von Retikulozyten in verschiedenen Altersklassen

Die Fluoreszenzverteilungen der Retikulozyten wurden in drei Klassen (I, II, III, Abb. 11.33), eingeteilt, so daß sich jeweils gleiche Intervalle für die Fluoreszenzintensitäten ergeben. Die relativen Anteile der Retikulozyten der einzelnen Klassen, $N_{Ret}(Klasse)/N_{Ret}$ wurde für alle gemessenen Verteilungen bestimmt. Die Werte vor Bestrahlung und die jeweiligen Werte der einzelnen Blutentnahmen nach Bestrahlung wurden gemittelt. Der zeitliche Verlauf der relativen Anteile der einzelnen Klassen ist in Abb. 11.34 (untere Grafik) dargestellt. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen der jeweiligen Mittelwerte. Da die Anteile der jungen Retikulozyten (Klasse II und III) nach Bestrahlung abnehmen, steigt der relative Anteil der älteren Retikulozyten (Klasse I) noch an und erreicht nach 3-4 Tagen den Wert 1. D. h. zu diesem Zeitpunkt sind nur noch wenige reife Retikulozyten der Klasse I im peripheren Blut vorhanden. Erst ca. 8-10 Tage nach Bestrahlung werden wieder junge Retikulozyten gebildet, die in den Klassen II und III registriert werden. Die relativen Anteile dieser Klassen steigen daher ab diesem Zeitpunkt an. Dabei nimmt der Anteil der jüngeren Retikulozyten (Klasse III) stärker zu als der Anteil der etwas reiferen Retikulozyten (Klasse II). Der Grund dafür ist das zunehmende Auftre-

ten junger Retikulozyten mit erheblich erhöhter Fluoreszenzintensität. 13-15 Tage nach Bestrahlung geht dieser Anteil junger Retikulozyten (Klasse III) wieder zurück, während der Anteil der Klasse II noch leicht ansteigt, d.h. das rechte Ende der Verteilung verschiebt sich wieder nach links. Die Fluoreszenzintensität der von rechts in die Verteilung hineinlaufenden jungen Retikulozyten nimmt wieder ab. Nach 3-4 Wochen nähern sich die Werte wieder dem Ausgangszustand.

Abb. 11.35 zeigt einen Vergleich der Ergebnisse der beiden Färbemethoden (TO und AO) mit dem mit einem einfachen Modell (siehe Abb. 11.31) berechneten zeitlichen Verlauf des Retikulozytenwertes R und des Medians \bar{F} der Fluoreszenzverteilung während der ersten drei Tage nach Bestrahlung. Offensichtlich ermöglicht die neue Farbstoff Thiazolorange (TO) die Messung von Fluoreszenzverteilungen der Retikulozyten mit sehr geringem Untergrundanteil, während die mit AO gemessenen Fluoreszenzverteilungen bei geringen Retikulozytenwerten von unspezifischem Untergrund dominiert werden. Anhand eines zusätzlichen Tierexperiments konnte damit gezeigt werden, daß diese neue Methode geeignet ist, Veränderungen der Altersverteilungen der Retikulozyten nach Bestrahlung zu messen.

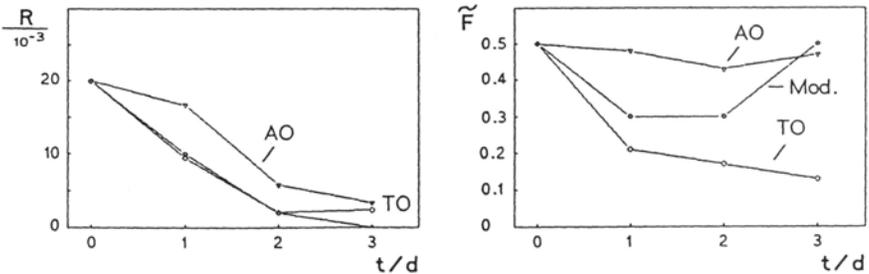


Abb. II.35 Vergleich des mit verschiedenen Färbemethoden gemessenen Verlaufs des Retikulozytenwertes R und des Medians \bar{F} der Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten von Kaninchen während der ersten drei Tage nach Ganzkörperbestrahlung mit $D = 8$ Gy. Die Symbole \circ kennzeichnen die mit einem einfachen Modell berechnete Werte, die Symbole \triangle die mit der AO-Färbung gemessenen Werte (siehe Abb. II.22 und II.30) und die Symbole \diamond die mit der TO-Färbung gemessenen Werte (Abb. II.34).

Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Im folgenden sollen die wesentlichen Ergebnisse der Messungen des Retikulozytenwertes und der Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten im peripheren Blut von bestrahlten Kaninchen kurz zusammengefaßt werden. Anschließend sollen die Konsequenzen dieser Ergebnisse für die Genauigkeit der Abschätzung einer unbekanntem Strahlendosis in

einem Versuchstier wie dem hier näher untersuchten Kaninchen diskutiert werden. Es soll die Frage gestellt werden, inwieweit es möglich ist, mit durchflußzytometrischen Messungen der Retikulozyten und ihrer Fluoreszenzverteilung zu bestimmten Zeiten nach einer Ganzkörperbestrahlung die Ganzkörperdosis in diesem Tiermodell zu bestimmen.

Diese Frage ist von erheblicher Bedeutung für eine mögliche biologische Dosimetrie mit Hilfe dieser Messungen. Es soll deswegen auch besonderer Wert auf die Untersuchung der Genauigkeit dieser Dosimetrie gelegt werden sowie auf die Parameter, die diese Genauigkeit beeinflussen können. Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Möglichkeit einer Biologischen Dosimetrie beim Menschen zu klären. Deshalb soll gegen Ende dieses Abschnitts auf die Untersuchungen des Retikulozytenwertes im Menschen, die gleich anschließend S. 98 beschrieben werden, um auf die mögliche Problematik dieses Parameters für eine Biologische Dosimetrie am Menschen, die schon in diesem Tiermodell zu erkennen ist, hingewiesen werden.

Ionisierende Strahlung führt neben vielen anderen Effekten durch Schädigung der entsprechenden Stammzellen im Knochenmark zu einer Inhibierung der Erythropoese, wie schon erläutert wurde. Je nach Dosis überleben mehr oder weniger Stammzellen. Eine Folge dieser Schädigung ist eine Abnahme der Retikulozyten im peripheren Blut, die sich wegen deren kurzer Reifungsdauer (etwa 2-3 Tage) relativ schnell nachweisen läßt. Wegen des sehr geringen Anteils der Retikulozyten im peripheren Blut ist eine Messung des Retikulozytenwertes, d. h. des relativen Anteils der Retikulozyten unter allen roten Blutzellen (Erythrozyten und Retikulozyten), mit konventionellen Methoden durch mikroskopische Auswertung zeitraubend und mit erheblichen Fehlern behaftet.

1. Mit den beschriebenen durchflußzytometrischen Methoden gelang es, den Retikulozytenwert im Blut von Kaninchen sehr schnell und mit einer hohen Genauigkeit zu messen. Diese Technik wurde hier benutzt, um zunächst in unbestrahlten Kaninchen die Variation des Retikulozytenwertes, und zwar die inter-individuelle wie auch die intra-individuelle Variation, zu untersuchen. Es zeigte sich, daß die Retikulozytenwerte verschiedener Kaninchen erheblich voneinander abweichen konnten. Der Median des Retikulozytenwertes war $R = 25,1 \times 10^{-3}$, der Streufaktor war dabei mit $S_f = 1,29$ recht erheblich, so daß Retikulozytenwerte in unbestrahlten Kaninchen zwischen $R = 12 \times 10^{-3}$ und 46×10^{-3} beobachtet wurden.

Erheblich geringere Streufaktoren ergaben sich, wenn nur die intra-individuellen Variationen des Retikulozytenwertes betrachtet wurden, d. h. die zeitlichen Veränderungen des Retikulozytenwertes eines

Kaninchens über längere oder kürzere Zeitintervalle. Es wurde ein mittlerer Streufaktor von $S_f = 1,10$ beobachtet, wenn die Retikulozytenwerte von Kaninchen nur über 5 Tage hinweg gemessen wurden, sowie ein mittlerer Streufaktor von $S_f = 1,16$, wenn sie über etwa 30 Tage hinweg gemessen wurden. Wie sich im folgenden zeigen wird, sind die Variation der Retikulozytenwerte, bzw. die Höhe dieser Streufaktoren die wesentlichen Gründe für die Grenzen der Dosisabschätzung bei einer Biologischen Dosimetrie mit Hilfe der Bestimmung des Retikulozytenwertes nach einer Ganzkörperbestrahlung.

2. Nach einer Ganzkörperbestrahlung der Kaninchen mit Dosen zwischen 2 und 8 Gy ließ sich eine Abnahme der Mediane des Retikulozytenwertes schon einen Tag nach Bestrahlung beobachten. Je nach Dosis wurde am 2.-3. Tag nach Bestrahlung ein Minimum erreicht, dessen Wert ebenfalls von der Dosis abhing. Beginnend mit dem dritten Tag nach Bestrahlung stieg der Median des Retikulozytenwertes wieder an und erreichte je nach Dosis zwischen dem 4. und 9. Tag wieder den Wert vor der Bestrahlung. Auffallend war auch hier wieder die große inter-individuelle Variation der Retikulozytenwerte nach Bestrahlung.

3. Der Median des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung nahm exponentiell mit der Dosis nach der Gleichung $R_3 = 25,4 \times e^{-0,27 D}$ ab. Die Streufaktoren nahmen exponentiell mit der Dosis zu: $S_f = 1,18 \times e^{0,047 D}$.

4. Wegen der großen inter-individuellen Variation des Retikulozytenwertes liegt die Nachweisgrenze einer Ganzkörperdosis eines bestrahlten Versuchstieres durch eine einzige Messung des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung bei nur etwa 4 Gy, wenn von einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p_i = 0,95$ ausgegangen werden muß. Ein Kaninchen mit einem Retikulozytenwert am dritten Tag nach Bestrahlung von z.B. $R_3 = 20 \times 10^{-3}$ kann eine Ganzkörperdosis zwischen $D = 0$ und etwa 4 Gy erhalten haben.

5. Die inter-individuelle Variation des Retikulozytenwertes kann durch eine zusätzliche Messung im Versuchstier unmittelbar vor oder nach der Bestrahlung ausgeschlossen werden. Für eine Dosisabschätzung spielt dann nur noch die intra-individuelle Variation eine wesentliche Rolle. Der Median der relativen Abnahme des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung nahm ebenfalls exponentiell mit der Dosis ab: $R_3/R_0 = e^{-0,28 D}$. Auch hier nahmen die Streufaktoren exponentiell mit der Dosis zu: $S_f = 1,10 \times e^{0,048 D}$. Der Grund für die Zunahme des Streufaktors mit der Dosis ist wahrscheinlich eine unterschiedliche individuelle Strahlenempfindlichkeit der einzelnen Versuchstiere.

6. Wegen der im Vergleich zur inter-individuellen Variation geringeren intra-individuellen Variation des Retikulozytenwertes kann eine unbe-

kannte Ganzkörperdosis eines bestrahlten Versuchstieres mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p_1 = 0,95$ durch Messung der relativen Abnahme des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung mit einer Empfindlichkeit von etwa 2 Gy bestimmt werden. Ein Kaninchen mit $R_3/R_0 = 0,8$ kann eine Dosis zwischen 0 und etwa 2 Gy erhalten haben.

7. Eine Teilkörperbestrahlung einer Körperhälfte des Kaninchens und damit der Hälfte seines Knochenmarks mit einer Dosis von $D = 8$ Gy führte zu qualitativ gleichen Effekten wie eine Ganzkörperbestrahlung, nämlich zu einer Abnahme des Medians der Retikulozytenwerte innerhalb der ersten drei Tage nach Bestrahlung. Es wurde ein Minimum wie nach einer Ganzkörperbestrahlung mit etwa 2 Gy beobachtet. Der Median des Retikulozytenwertes erreichte aber erst nach etwa 9 Tagen den Wert vor Bestrahlung. Die Ergebnisse waren dieselben bei Kaninchen, deren vordere Körperhälften bestrahlt wurde wie bei Kaninchen, deren hintere Körperhälfte exponiert wurde. Der zeitliche Verlauf des Medians der Retikulozytenwerte in teilkörperbestrahlten Kaninchen konnte auch quantitativ damit erklärt werden, daß die unbestrahlte Hälfte des Knochenmarks weiterhin zur Erythropoese in der Lage ist und unabhängig vom bestrahlten Teil des Knochenmarks junge Retikulozyten in das periphere Blut ausschüttet.

8. Zusätzlich zur Messung des Retikulozytenwertes wurde auch die Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten als Funktion der Zeit nach Bestrahlung untersucht und analysiert. Durch die strahleninduzierte Inhibierung der Neubildung von Retikulozyten im Knochenmark war zu erwarten, daß zunächst der Anteil junger Retikulozyten im peripheren Blut abnahm und einige Tage nach Bestrahlung wieder zunahm, wenn genügend neue Stammzellen im Knochenmark gebildet worden waren. Bei der Acridinorange-Färbung der Retikulozyten konnte jedoch nur eine geringe Verschiebung der Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten in den ersten drei Tagen nach Bestrahlung beobachtet werden. Dieser geringe Effekt wurde auf den bei dieser Methode möglicherweise in den Verteilungen auftretenden unspezifischen Untergrund zurückgeführt, der besonders bei sehr niedrigen Retikulozytenwerten die Fluoreszenzverteilung der Retikulozyten dominiert. Mit Hilfe der neuen Thiazolorange-Färbung konnte jedoch eine starke Abnahme des Medians der Fluoreszenzverteilungen der Retikulozyten in den ersten drei Tagen nach Bestrahlung beobachtet werden. Auch die Fluoreszenzverteilungen der Retikulozyten zeigten deutlich, daß schon am zweiten Tag nach Bestrahlung praktisch keine jungen, sondern nur noch alte Retikulozyten auftraten. Gleichzeitig mit dem Anstieg der Retikulozytenwerte zwischen dem 5. und 7. Tag nach Bestrahlung nahm der Anteil der jungen Retikulozyten mit hoher Thiazolorange-Fluoreszenz kräftig zu und damit auch der Median ihrer Fluoreszenzverteilung.

Konsequenzen dieser Untersuchungen für eine mögliche Biologische Dosimetrie nach Ganzkörperbestrahlung

Es konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, daß es mit Hilfe von durchflußzytometrischen Messungen des Retikulozytenwertes in Kaninchen nach einer Gänzkörperbestrahlung mit Dosen im Bereich von $D = 2$ bis 8 Gy im Prinzip möglich ist, die Ganzkörperdosis abzuschätzen. Durch die strahleninduzierte Schädigung der Stammzellen im Knochenmark sinkt der Retikulozytenwert bis zu drei Tagen nach Bestrahlung ab, um danach anzusteigen, wenn die überlebenden Stammzellen im Knochenmark proliferieren und junge Retikulozyten erzeugen. Das Minimum am dritten Tag nach Bestrahlung nimmt dabei exponentiell mit der Dosis ab, so daß aus dem Retikulozytenwert am dritten Tag nach Bestrahlung die Dosis abgeschätzt werden kann. Die Grenzen einer solchen „Biologischen Dosimetrie“ werden dabei im wesentlichen von der inter-individuellen Variation des Retikulozytenwertes einzelner Kaninchen beeinflusst, der etwa um den Faktor 4 von Tier zu Tier schwanken kann. Dadurch ist eine Dosisabschätzung mit Hilfe einer einzigen Messung des Retikulozytenwertes nur mit einer Nachweisgrenze von etwa 5 Gy möglich. Wenn eine zusätzliche Messung des Retikulozytenwertes vor oder unmittelbar nach Bestrahlung durchgeführt wurde, läßt sich durch Berechnung der relativen Abnahme des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung wegen der dann erheblich geringeren intra-individuellen Variation des Retikulozytenwertes die Ganzkörperdosis mit einer Nachweisgrenze von etwa 2 Gy bestimmen.

Zusätzliche Informationen zur Verbesserung der Dosisabschätzung sind möglicherweise durch eine Analyse der im Durchflußzytometer gemessenen Altersverteilung der Retikulozyten zu erhalten. Die neue Thiazolorange-Technik zur Anfärbung der Retikulozyten scheint dazu im Gegensatz zu der bei den meisten Experimenten in diesem Kapitel verwendeten Acridinorange-Technik geeignet zu sein. Das frühe Auftreten von jungen Retikulozyten einige Tage nach der Bestrahlung kann ein wichtiger Hinweis darauf sein, daß genügend Stammzellen überlebt haben und wiederum neue Retikulozyten produzieren, so daß das Versuchstier letztlich die Bestrahlung überlebt.

Wegen der hohen Eisenaufnahmerate der neugebildeten jungen Retikulozyten können wenige junge Retikulozyten schon frühzeitig nach Bestrahlung registriert werden. Auch die Kenntnis dieses zusätzlichen Parameters kann dazu führen, daß schon relativ früh nach Bestrahlung eine Erholung der Stammzellen im Knochenmark erkannt wird. Da bei beiden möglichen zusätzlichen Parametern jeweils auch der Retikulozytenwert eingeht, wird jedoch eine bessere Dosisabschätzung durch zusätzliche Messungen der zeitlichen Abhängigkeit der Altersverteilung

der Retikulozyten wegen der großen inter- und intra-individuellen Variation der Retikulozytenwerte nicht möglich sein.

Da natürlich alle in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen dazu dienen sollen, die Grundlagen und die Grenzen einer „Biologischen Dosimetrie“ beim Menschen mit Hilfe von durchflußzytometrischen Messungen des Retikulozytenwertes besser verstehen zu können, sollen die wesentlichen Ergebnisse dieser Untersuchungen auch bei den Messungen von Retikulozytenwerten im Menschen beispielhaft verwendet werden. Es ist zu erwarten, daß auch beim Menschen die inter- bzw. intra-individuelle Variation des Retikulozytenwertes für eine biologische Dosimetrie die begrenzende Rolle spielen werden. Da Experimente an bestrahlten Menschen nicht möglich sind (Messungen an therapeutisch bestrahlten Patienten sind nur sehr eingeschränkt zu verwenden), müssen und sollen die Ergebnisse der Tierversuche in die Abschätzungen der Möglichkeiten und Grenzen einer Biologischen Dosimetrie einfließen. Im folgenden Abschnitt sollen deswegen zunächst die Ergebnisse der Untersuchungen des Retikulozytenwertes in normalen, gesunden Menschen dargestellt werden.

Retikulozytenwert beim Menschen

Vorbemerkung

Im vorhergehenden Abschnitt wurden die Möglichkeiten einer Biologischen Dosimetrie im Tiermodell mit Hilfe der Messung von Retikulozyten im peripheren Blut von Kaninchen ausführlich untersucht. Die in diesen Experimenten gewonnenen Ergebnisse sollen dazu verwendet werden, die Möglichkeiten und Grenzen einer Dosisbestimmung beim Menschen abzuschätzen. Bei den Tierexperimenten hat sich gezeigt, daß wegen der großen inter-individuellen Variation des Retikulozytenwertes schon bei den unbestrahlten Kaninchen die Nachweisgrenze einer Dosisabschätzung mit Hilfe nur einer einzigen Messung des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung bei über 4 Gy liegt.

Damit ist diese Methode nicht für eine Beurteilung der Strahlenkrankheit, wie sie für eine klinische Versorgung der Betroffenen notwendig ist, geeignet. Es wurde deshalb vorgeschlagen, durch zwei Messungen – eine Messung unmittelbar nach Bestrahlung und eine nach drei Tagen – die Abnahme des Retikulozytenwertes zu bestimmen. Damit ist die Unsicherheit der Dosisabschätzung nur noch abhängig von der erheblich geringeren intra-individuellen Variation der Retikulozytenwertes. Mit diesem Verfahren lag die Nachweisgrenze der Dosisabschätzung bei etwa 2 Gy, was für eine Beurteilung der Strahlenkrankheit bezüglich

einer klinischen Versorgung von verunglückten Personen ausreichend wäre.

Da zu erwarten ist, daß eine Biologische Dosimetrie auch beim Menschen im wesentlichen von der inter- und intra-individuellen Variation des Retikulozytenwertes begrenzt wird, sollen im folgenden diese Parameter beim Menschen gemessen werden. Wie sich bei den entsprechenden Untersuchungen bei Kaninchen zeigte, ist die intra-individuelle Variation der Retikulozytenwerte abhängig vom Beobachtungszeitraum. Innerhalb kurzer Zeitintervalle zeigten die Werte geringere Schwankungen als innerhalb längerer Zeitintervalle, wie im Abschnitt „Intra-individuelle Variation des Retikulozytenwertes“ gefunden wurde (S. 62 ff.) Für eine Dosisabschätzung mit dem oben beschriebenen Verfahren ist im wesentlichen der Verlauf des Retikulozytenwertes innerhalb der ersten 3-4 Tage nach Bestrahlung von Bedeutung. Die Genauigkeit einer solchen Dosisabschätzung wird daher vor allem durch die Schwankungen des Retikulozytenwertes innerhalb dieses Zeitraumes begrenzt.

In der Vergangenheit wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Untersuchungen über den Retikulozytenwert beim Menschen unter Normalbedingungen durchgeführt. Es wurde sowohl der Normalbereich des Retikulozytenwertes beim Menschen (Inter-individuelle Variation) als auch die Schwankungen des Retikulozytenwertes bei einzelnen gesunden Personen innerhalb verschiedener Zeitintervalle (intra-individuelle Variation) untersucht. Eine Übersicht über die von verschiedenen Autoren veröffentlichten Retikulozytenwerte und der zugehörigen Normalbereiche beim Menschen (inter-individuelle Variation) sind in Tabelle II. 8 zusammengefaßt.

Die zum Teil erheblichen Abweichungen der von verschiedenen Autoren angegebenen mittleren Retikulozytenwerte entstehen zum Teil durch die Verwendung unterschiedlicher Färbemethoden aber auch durch die nicht einheitliche Definition der als Retikulozyten gezählten Zellen. Einige Autoren zählen Zellen mit nur einem einzigen gefärbten Einschluß als Retikulozyten, andere verlegen die Grenze etwas zu jüngeren Retikulozyten mit mehreren gefärbten Einschlüssen.

Einige Autoren beobachteten, daß sowohl der mittlere Retikulozytenwert als auch seine Schwankungen bei Männern und Frauen unterschiedlich sind. Die Häufigkeitsverteilungen der bei 48 Männern und 30 Frauen gemessenen Retikulozytenwerte ergaben eine bimodale Verteilung für die Werte der Frauen, während die Werte der Männer eine eingipflige Verteilung zeigte (Deiss und Kruth, 1970). Diese zu höheren Werten größere Variation des Retikulozytenwertes wurde mit der erhöhten Blutbildung bei Frauen während der Menstruation interpretiert (Deiss und Kurth, 1970, Seip, 1953).

Tabelle II.8 Retikulozytenwerte und Normalbereich bei gesunden Erwachsenen nach Angaben verschiedener Autoren.

Referenz	mittlerer Retikulozytenwert $\times 10^3$	Normalbereich $\times 10^3$ (95 %-Grenzen)
Begemann und Rastetter, 1978	10	5–15
Cartwright, 1968	15	5–25
Dacie und Lewis, 1963	—	2–20
Deiss und Kurth, 1970	m: 16,5 f: 24,5	8–26 8–41
Frankel und Reitman, 1963	—	5–15
MacKinney et al. 1962	26	10–42
Miale, 1967	—	5–15
Nizet, 1946	—	15–25
Page und Culver, 1960	—	5–15
Seip, 1953	15,7 m: 13,5 f: 17,3	9,6–23,8 9,6–18,4 10,4–23,8
Theml 1983	m: 16 f: 24	8–25 8–40
Trachtenberg, 1932	8	3–14
Watson, 1950	7,5 m: 6 f: 9	1,3–13,7 1,6–10,4 2,6–15,4
Wintrobe, 1981	m: 16 f: 17	8–25 8–41

Untersuchungen der Schwankungen des Retikulozytenwertes bei einzelnen Personen unter Normalbedingungen sind von verschiedenen Autoren durchgeführt worden. Ederle bestimmte den Retikulozytenwert eines Mannes alle 2-3 Tage über insgesamt 5 Wochen (Ederle, 1933). Dabei fand er, daß aufeinanderfolgende Werte nur geringfügige Abweichungen zeigten. Die Werte schwankten im Bereich $R = 12 - 18 \times 10^3$, wobei die meisten nahe bei $R = 15 \times 10^3$ lagen. Andere Auto-

ren fanden dagegen relativ große Abweichungen der Retikulozytenwerte einzelner Personen von einem auf den nächsten Tag (Langendorff und Reisner, 1936, Barbier, 1939). Die Ergebnisse von Nizet zeigten, daß die an 4-5 aufeinanderfolgenden Tagen gemessenen Retikulozytenwerte und die über einen Zeitraum von einem Jahr jeweils im Abstand von 8-10 Tagen gemessenen Werte bei einzelnen Versuchspersonen innerhalb der Meßgenauigkeit keine signifikanten Abweichungen aufwiesen (Nizet, 1946). Diese Ergebnisse wurden von Seip bestätigt, der zusätzlich eventuelle Veränderungen in der Altersverteilung der Retikulozyten untersuchte (Seip, 1953). Auch er konnte bei wiederholten Messungen des Retikulozytenwertes innerhalb 24 Stunden und an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen keine Signifikanten Abweichungen nachweisen.

Bei allen bisherigen Untersuchungen dieser Art wurden die Retikulozytenwerte durch Auszählen mit dem Mikroskop bestimmt. Die Ergebnisse beinhalten daher die große Meßgenauigkeit dieser Methode. Genauere und besser vergleichbare Ergebnisse können mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden zur durchflußzytometrischen Bestimmung des Retikulozytenwertes gewonnen werden. Es wurden deshalb bei insgesamt 19 Versuchspersonen eine Reihe von Messungen des Retikulozytenwertes mit der neuen TO-Färbetechnik durchgeführt und die Variation der Werte analysiert. Dabei stand die Variation der Retikulozytenwerte bei einzelnen Personen (intra-individuelle Variation) innerhalb kurzer Zeitintervalle im Vordergrund, da diese für die Genauigkeit bei der Dosisabschätzung eine entscheidende Rolle spielt.

Im nächsten Abschnitt, S. 115 ff., soll mit den Ergebnissen des vorhergehenden Kapitels (dosisabhängige Abnahme des Retikulozytenwertes nach Bestrahlung) und den Ergebnissen dieses Abschnitts (Variation des Retikulozytenwertes beim Menschen) versucht werden, die Möglichkeiten und Grenzen einer Biologischen Dosimetrie beim Menschen abzuschätzen. Dabei muß vorausgesetzt werden, daß das blutbildende System des Kaninchens bezüglich der Strahlenwirkung mit dem des Menschen vergleichbar ist. Hinweise dafür können möglicherweise aus Messungen an therapeutisch bestrahlten Patienten gewonnen werden. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen sind aber im allgemeinen nur sehr eingeschränkt zu verwenden, da die Effekte der Bestrahlung meist mit begleitenden Behandlungen (Chemotherapie, Operation, Blutverlust, etc.) und mit Veränderungen des Blutbildes aufgrund der Erkrankung selbst interferieren, wodurch die Daten schwer zu interpretieren sind.

Bei therapeutischen Teilkörperbestrahlungen sind die zu erwartenden Effekte nur gering, da hier meist nur ein relativ geringer Anteil des Kno-

chenmarks bestrahlt und die Gesamtdosis in mehrere Fraktionen aufgeteilt wird. Ziel einer solchen Behandlung ist schließlich die selektive Zerstörung eines Tumors, wobei eine Schädigung des Knochenmarks und anderer Organ so gering wie möglich sein sollte.

Bei therapeutischen Ganzkörperbestrahlungen von an Leukämie erkrankten Patienten sollen die Leukämie-Zellen im Knochenmark möglichst vollständig zerstört werden. Dabei werden allerdings auch alle normalen Stammzellen des Knochenmarks, aus denen alle Blutzellen hervorgehen, zerstört. Im Anschluß an die Bestrahlung erhalten diese Patienten deshalb eine Knochenmark-Transplantation, die sie mit neuen Stammzellen versorgt. Zwar sind bei einer solchen Ganzkörperbestrahlung größere Effekte zu erwarten, jedoch sind auch die Daten solcher Patienten, wegen zusätzlicher Behandlungen (Chemotherapie) und der Veränderungen des gesamten Blutbildes durch die Erkrankung selbst, schwer zu interpretieren.

Weitere Informationen über die Strahlenwirkung auf das haematopoetische System des Menschen können aus Untersuchungen an den Opfern von Strahlenunfällen gewonnen werden.

Im folgenden sollen einige Ergebnisse solcher Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen kurz referiert werden.

Ausführliche Untersuchungen sowohl der Zahl der Retikulozyten im peripheren Blut als auch ihrer Altersverteilung bei Patienten während einer therapeutischen Teilkörperbestrahlung wurden schon von Mardersteig durchgeführt (Mardersteig, 1937, 1938). Die insgesamt 27 Patienten, die an unterschiedlichen Karzinomen erkrankt waren, erhielten fraktionierte Röntgenbestrahlungen (180 kV) mit Gesamtdosen von $D = 5$ bis 13 Gy innerhalb 14 bis 30 Tagen. Die zeitlichen Verläufe der Retikulozytenwerte von Patienten mit Bronchial-, Ösophagus-, und Leberkarzinomen während und nach den Bestrahlungszyklen lassen sich im wesentlichen in drei Fälle unterscheiden:

1. Der Retikulozytenwert nimmt zunächst leicht zu, danach folgt ein Absinken der Retikulozytenwerte. Etwa nach 8-10 Tagen nimmt der Retikulozytenwert wieder zu und steigt erheblich über den Ausgangswert hinaus an.
2. Der Retikulozytenwert nimmt anhaltend zu und fällt erst spät nach Ende der Bestrahlung wieder ab.
3. Der Retikulozytenwert nimmt ohne den initialen Anstieg unmittelbar nach der ersten Bestrahlung ab und nimmt nach drei Tagen wieder zu.

In den ersten beiden Fällen wurde während der Zunahme der Werte gleichzeitig eine Verschiebung der Anteile der Retikulozyten in den einzelnen Reifungsstadien (Gruppen I-IV) in Richtung junger Retikulozyten beobachtet; bei der Abnahme der Werte zeigte sich eine Verschiebung in die entgegengesetzte Richtung. Im 3. Fall konnte eine Veränderung der Altersverteilung nicht beobachtet werden.

Bei den Patienten mit Magenkarzinomen und Knochenmetastasen zeigten die Retikulozytenwerte sehr unterschiedliche Verläufe. Der Autor interpretiert dies durch eine starke Beanspruchung bzw. Schädigung des blutbildenden Systems durch den Krankheitsprozeß schon vor der Bestrahlung.

Dealy und Tubiana beobachteten die Abnahme des Retikulozytenwertes bei drei Patienten nach einer Ganzkörperbestrahlung mit $D = 4,5$ Gy (Dealy und Tubiana, 1964). Bei allen Patienten wurde die Dosis in zwei Fraktionen aufgeteilt, mit $D = 2,5$ Gy bei der ersten Bestrahlung und $D = 2$ Gy bei der zweiten Bestrahlung, die sieben Tage nach der ersten gegeben wurde. Der mittlere Retikulozytenwert der drei Patienten nahm in der Woche nach der ersten Bestrahlung von $R = 12 \times 10^{-3}$ auf $R = 4,5 \times 10^{-3}$ und in der darauffolgenden Woche nach der zweiten Bestrahlung nochmals auf $R = 2,5 \times 10^{-3}$ ab.

McFarland und Pearson berichten über haematologische Effekte bei 5 Patienten nach einer Ganzkörperbestrahlung (McFarland und Pearson, 1963). Die Patienten wurden mit γ -Strahlung von ^{60}Co und Einzeldosen von $D = 2,25$ Gy bis 9 Gy behandelt. Davon erhielt ein Patient eine Dosis von $D = 9$ Gy. Der Retikulozytenwert nahm bei diesem Patienten zunächst ab, nach einem leichten Wiederanstieg aufgrund einer Infusion mit autologem Knochenmark sank er schließlich bis auf 0 ab. Erst ab dem 20. Tag nach Bestrahlung zeigte sich ein leichter Wiederanstieg. Drei weitere Patienten wurden mit einer Einzeldosis von $D = 4,5$ Gy bestrahlt. Bei zwei dieser Patienten konnte eine deutliche Abnahme des Retikulozytenwertes trotz Infusion von autologem Knochenmark am zweiten bzw. dritten Tag nach Bestrahlung beobachtet werden. Bei dem dritten Patient aus dieser Gruppe zeigte sich ebenso wie bei dem mit einer Einzeldosis von $D = 2,25$ Gy bestrahlten Patient keine signifikante Abnahme des Retikulozytenwertes. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Mathe und Mitarbeiter bei Patienten nach Ganzkörperbestrahlungen. Diese Patienten erhielten Bestrahlungen mit γ -Strahlung von ^{60}Co und Einzeldosen von $D = 5$ Gy bis 8,5 Gy (Mathe et al., 1964).

Glöbel konnte bei Patienten nach Teilkörperbestrahlung (Kopf-, Thorax-, und Abdominalbestrahlungen mit $D = 50$ Gy in 20-30 Fraktionen innerhalb 4 Wochen) keine signifikante Abnahme des Retikulozyten-

wertes beobachten: Dagegen führte die interne Bestrahlung mit Jod-J.31 (effektive Strahlendosis: $D = 1,8 \text{ Gy}$) zu einer eindeutigen Abnahme innerhalb von 3 Tagen nach Inkorporation (Glöbel, 1988).

Fliedner und Mitarbeiter untersuchten die Konzentration verschiedener Blutzellen als Funktion der Zeit nach Bestrahlung in fünf, bei einem Unfall in Oak Ridge strahlenexponierten Personen, die Dosen zwischen 2,36 und 3,65 Gy erhalten hatten (Fliedner et al., 1962). Auch die Opfer eines Strahlenunfalls in Jugoslawien wurden untersucht (Fliedner, 1960, Andrews, 1962). Die Betroffenen erhielten dabei Strahlendosen von $D = 3$ bis 10 Sy . Die Autoren konnten keine signifikante Abnahme des Retikulozytenwertes in den ersten Tagen nach Strahlenexposition beobachten, jedoch einen Anstieg des Retikulozytenwertes zwischen 35 bis 60 Tagen auf etwa das dreifache des Ausgangswertes.

Carpajj untersuchte eine Reihe von hämatologischen Parametern bei strahlenexponiert arbeitenden Personen, unter anderem den Retikulozytenwert (Carpajj, 1981). Er konnte zeigen, daß keiner dieser Parameter als Dosisindikator für den Nachweis von $0,5 \text{ Sv/a}$ geeignet war.

Auch bei diesen Untersuchungen wurden die Retikulozytenwerte durch Auszählen mit dem Mikroskop bestimmt. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse durchflußzytometrischer Messungen des Retikulozytenwertes bei gesunden Personen sowie bei Patienten während einer Strahlentherapie dargestellt.

Retikulozytenwert im Blut von gesunden Probanden

Inter-individuelle Variation des Retikulozytenwertes

Bei insgesamt 19 Probanden wurde über einen Zeitraum von einem Jahr in unregelmäßigen Zeitabständen Blut entnommen und der Retikulozytenwert mit der beschriebenen Methode bestimmt. Die Häufigkeitsverteilung der insgesamt 251 Meßwerte ist in Abb. II.36 dargestellt. An diese Verteilung wurde eine Log-Normalverteilung angepaßt. Es ergab sich ein Median $\bar{R} = 15,6 \times 10^{-3}$ und ein Streufaktor von $S_f = 1,40$. Dies entspricht einem Normalbereich von $8 \times 10^{-3} \leq R \leq 31 \times 10^{-3}$ für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p_i = 0,05$. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung zu den Angaben in der Literatur (Tabelle II.8: Deiss u. Kurth, 1970, Seip, 1953, Thendl, 1983, Wintrobe, 1967).

Verglichen mit dem Median der Retikulozytenwerte bei den unbestrahlten Kaninchen ($\bar{R} = 25,1 \times 10^{-3}$) liegen die Normalwerte beim Menschen erheblich niedriger. Die inter-individuelle Variation der Normalwerte beim Menschen ist mit einem Streufaktor von $S_f = 1,40$ größer als die bei den unbestrahlten Kaninchen beobachtete Variation ($S_f = 1,29$).

H

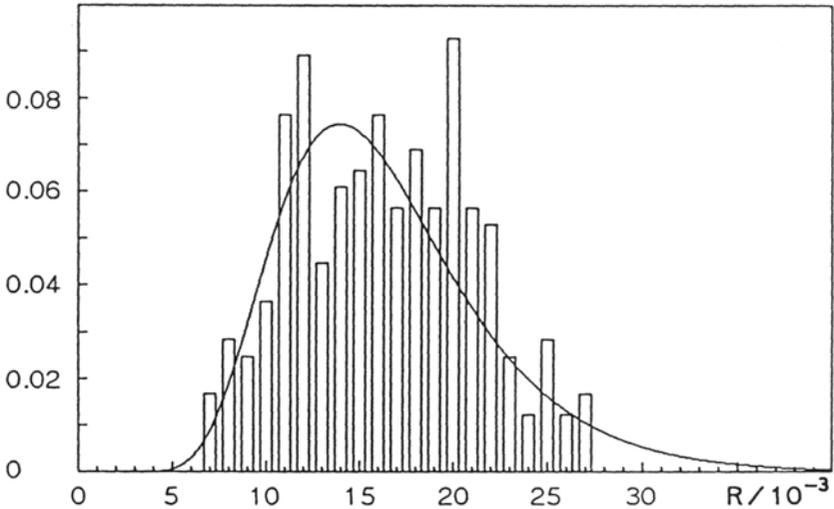


Abb. II.36 Relative Häufigkeit H der Retikulozytenwerte beim Menschen. Die Daten repräsentieren insgesamt 251 Einzelmessungen von 19 Personen über den Zeitraum eines Jahres. An die Werte wurde eine Log-Normalverteilung angepaßt. Der Median beträgt $\bar{R} = 15,6 \times 10^{-3}$ und der Streufaktor $S_r = 1,40$.

Intra-individuelle Variation des Retikulozytenwertes

Zusätzlich zu den über ein Jahr verteilten Messungen des Retikulozytenwertes wurde bei 12 Probanden (4 Frauen und 8 Männer) der Verlauf des Retikulozytenwertes über einen Zeitraum von vier Wochen gemessen. Die Blutentnahmen wurden bis auf wenige Ausnahmen bei einigen Personen an allen Arbeitstagen durchgeführt. Für jeden einzelnen Probanden standen damit zwischen 11 und 19 Messungen zur Verfügung.

Abb. 11.37 zeigt Beispiele für den zeitlichen Verlauf der Retikulozytenwerte von drei Personen. Person A zeigte über den gesamten Zeitraum der Messungen einen relativ hohen, Person H einen relativ niedrigen Retikulozytenwert. Der Retikulozytenwert dieser beiden Personen kann innerhalb der Fehlergrenzen der Meßgenauigkeit praktisch als konstant bezeichnet werden. Bei Person D steigt der Retikulozytenwert im Verlauf des Beobachtungszeitraumes leicht an. Jedoch sind auch hier die Schwankungen der Werte von einem Tag auf den nächsten kaum größer als die Meßunsicherheit.

Die Mediane der Retikulozytenwerte und Streufaktoren aller 12 Probanden sind in Tab. II.9 zusammengefaßt, und zwar jeweils für einen Beobachtungszeitraum von einem Jahr und für 4 Wochen. Bei Personen mit hohen Retikulozytenwerten waren die Streufaktoren meistens

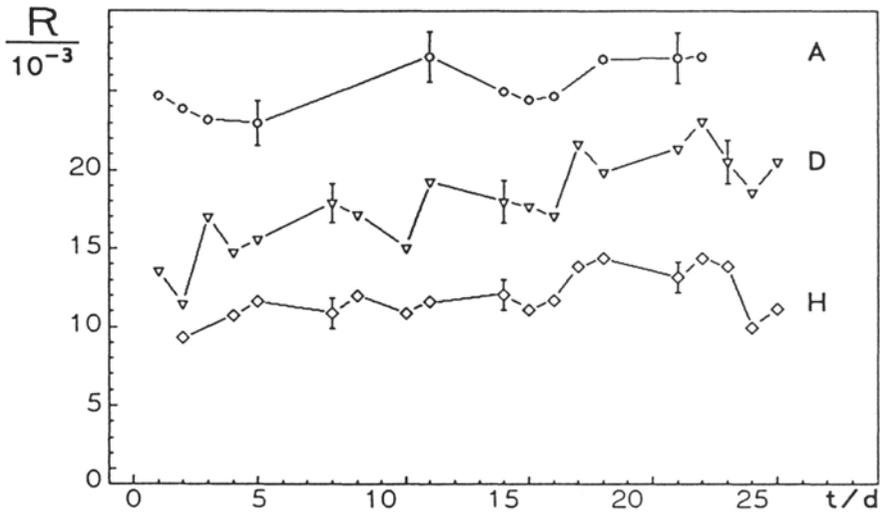


Abb. II.37 Beispiele für den zeitlichen Verlauf des Retikulozytenwertes von drei Probanden über 4 Wochen. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Unsicherheit der Meßwerte ($R \pm s$). Die Schwankungen der Werte der einzelnen Personen sind innerhalb kurzer Zeitabstände gering.

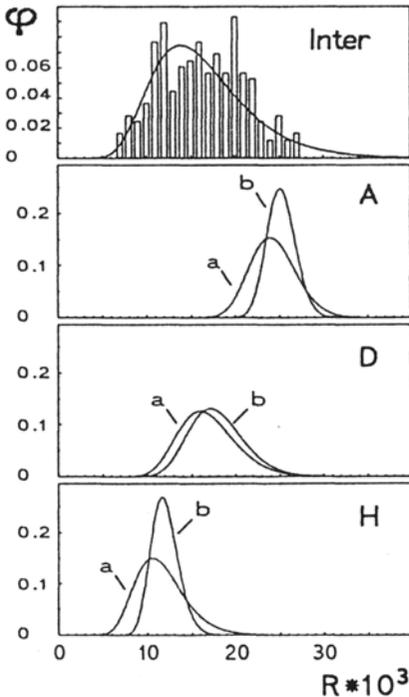


Abb. II.38 Einige Beispiele der berechneten Verteilungen der Retikulozytenwerte einzelner Personen (intra-individuelle Variation) im Vergleich zur Verteilung aller Werte der Probanden (inter-individuelle Variation). Die Verteilungen sind jeweils für die Variation des Retikulozytenwertes innerhalb eines Jahres (Kurve a) und innerhalb von 4 Wochen (Kurve b) berechnet. Die Variation nimmt innerhalb kleinerer Zeitintervalle ab.

geringer als bei Personen mit niedrigen Werten. Dies liegt zum Teil daran, daß der relative Fehler der Messung, der in diese Werte mit ein- geht, zu größeren Meßwerten hin abnimmt. Bei allen Personen war die Variation der Retikulozytenwerte über 4 Wochen geringer als die Varia- tion über ein Jahr.

In Abb. 11.38, links neben der Tabelle, sind die aus den Daten berechne- ten Wahrscheinlichkeitsverteilungen des Retikulozytenwertes für die drei oben gezeigten Beispiele (Abb. 11.37, Personen A, D und H) darge- stellt. Die Verteilungen der für die im Zeitraum von 4 Wochen gemesse- nen Werte (Kurve a) sind jeweils schmaler als die Verteilungen für die innerhalb eines Jahres gemessenen Werte (Kurve b).

Tabelle II.9 Mediane \bar{R} und Streufaktoren der Retikulozytenwerte von 12 Probanden. Zusätzlich zu den Messungen über ein Jahr ist bei diesen Personen der Retikulozytenwert über vier Wochen an fast allen Arbeitstagen gemessen worden (Verlauf des Retikulozytenwertes der Probanden A, D und H siehe Abb. 11.37). Die Streufaktoren der innerhalb 4 Wochen gemessenen Werte sind bei den meisten Personen erheblich geringer als die der über ein Jahr gemessenen Werte.

Proband	Jahr		4 Wochen	
	$\bar{R} * 10^3$	S_f	$\bar{R} * 10^3$	S_f
A	24,2	1,11	25,2	1,06
B	9,3	1,22	9,9	1,18
C	14,3	1,19	14,0	1,17
D	16,6	1,21	17,7	1,19
E	15,2	1,20	16,8	1,15
F	—	—	19,1	1,08
G	14,0	1,19	14,3	1,13
H	11,2	1,28	11,8	1,14
I	19,8	1,16	18,1	1,14
J	20,2	1,21	21,6	1,09
K	10,5	1,26	10,3	1,26
L	19,1	1,24	21,3	1,12

Zusätzlich wurden aus den innerhalb 4 Wochen gemessenen Daten die Streufaktoren der Retikulozytenwerte von jeweils fünf aufeinanderfolgenden Tagen berechnet. Dabei wurden die Werte nur dann gemittelt, wenn pro Woche mindestens 4 Meßwerte zur Verfügung standen. Die so berechneten Streufaktoren wurden für jeden einzelnen Proband gemittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. II.10 zusammengefaßt. Bei allen Probanden nehmen mit der weiteren Einschränkung des Beobachtungszeitraumes von 4 Wochen (Tab. II.9) auf 5 aufeinanderfolgende Tage die Streufaktoren der Retikulozytenwerte nochmals ab. Für den mittleren Streufaktor aller 12 Probanden ergibt sich für diesen Zeitraum $S_f = 1,11 \pm 0,03$.

Tabelle II.10 Intra-individuelle Variation des Retikulozytenwertes für einen Zeitintervall von jeweils 5 Tagen. Zunächst wurden die Streufaktoren der Werte von jeweils 5 aufeinanderfolgenden Tagen berechnet und anschließend für jeden einzelnen Proband gemittelt.

	$S_f(5\text{Tage})$	\bar{S}_f		$S_f(5\text{Tage})$	\bar{S}_f
A	1,03; 1,04	1,04	G	1,07; 1,17; 1,10	1,11
B	1,14; 1,24; 1,10; 1,15	1,16	H	1,12; 1,05; 1,12; 1,17	1,12
C	1,08; 1,09; 1,15; 1,19	1,13	I	1,19; 1,10; 1,07	1,12
D	1,16; 1,11; 1,10; 1,08	1,11	J	1,06; 1,02; 1,08; 1,11	1,07
E	1,06; 1,16	1,11	K	1,16; 1,14	1,15
F	1,04; 1,09; 1,12	1,08	L	1,08; 1,08; 1,13; 1,17	1,12

In Tab. 11.11 sind die Ergebnisse der inter-individuellen Variation der Retikulozytenwerte und der mittleren intra-individuellen Variation der Retikulozytenwerte für unterschiedliche Zeitintervalle zusammengefaßt. Wie schon an den Daten der Kaninchen gezeigt werden konnte, ist auch beim Menschen die intra-individuelle Variation des Retikulozytenwertes erheblich geringer als die inter-individuelle Variation. Für die intra-individuelle Variation des Retikulozytenwertes beim Menschen ergaben sich etwa die gleichen Streufaktoren wie beim Kaninchen. Innerhalb von 4 Wochen schwankte der Retikulozytenwert bei den Kaninchen um den Faktor $S_f = 1,16 \pm 0,06$ und innerhalb von 5 Tagen um den Faktor $S_f = 1,10 \pm 0,03$.

Tabelle 11.11 Inter-individuelle Variation des Retikulozytenwert beim Menschen und mittlere intra-individuelle Variation des Retikulozytenwertes bei 12 gesunden Personen innerhalb verschiedener Zeitintervalle. Vergleich zur inter-individuellen Variation. Die intra-individuelle Variation wird um so geringer, je kürzer die Zeitintervalle sind für die sie berechnet wird.

inter-individuelle Variation:	$S_f = 1,40$	$S_f^2 = 1,96$
mittlere intra-individuelle Variation (12 Personen)	$S_f = 1,21 \pm 0,05$	$S_f^2 = 1,46$ (1 Jahr)
	$S_f = 1,14 \pm 0,05$	$S_f^2 = 1,30$ (25 Tage)
	$S_f = 1,11 \pm 0,03$	$S_f^2 = 1,23$ (5Tage)

Retikulozytenwert bei Patienten während einer Strahlentherapie

Bei allen bisher durchgeführten Untersuchungen der Retikulozytenwertes beim Menschen nach Bestrahlung wurden die Retikulozytenwerte mit dem Mikroskop bestimmt. Diese Ergebnisse sind daher, insbesondere bei den nach Bestrahlung zu erwartenden geringen Retikulozytenwerten, mit einer sehr großen Ungenauigkeit behaftet.

Es wurden deshalb der Versuch gemacht, in Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Knochenmarktransplantation der Universitätsklinik Essen (Dr. Greven, Prof. Schäfer) und der Abteilung für Strahlentherapie des Nord-Westkrankenhauses in Frankfurt (Dr. Fink, Prof. Hassenstein) den zeitlichen Verlauf des Retikulozytenwertes im Blut von Patienten während einer Strahlentherapie mit einer durchflußzytometrieschen Methode zu bestimmen.

Diese Messungen wurden bei insgesamt 6 Patienten durchgeführt. Davon erhielten 4 dieser Patienten (Universitätsklinik, Essen) eine Ganzkörperbestrahlung zur Konditionierung vor einer Knochenmarkstransplantation, die beiden anderen (Nord-West-Krankenhaus, Frankfurt) erhielten therapeutische Teilkörperbestrahlung zur Tumorthherapie, wobei sich ein relativ großer Anteil (ca. 50 %) des Knochenmarks im Bestrahlungsfeld befand. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 11.39 und Abb. 11.40 dargestellt. Zusätzliche Informationen über die Grunderkrankung sowie über die Therapie der einzelnen Patienten sind in der Legende zu den Abbildungen angegeben.

Die Patienten A, B, C und D erhielten eine Ganzkörperdosis von $D = 10$ Gy in vier Fraktionen mit je 2,5 Gy an aufeinanderfolgenden Tagen. Patient A wurde unmittelbar vor Bestrahlung mit einer intensiven Chemotherapie behandelt. Über den gesamten Beobachtungszeitraum wurde deshalb bei diesem Patient ein sehr niedriger Retikulozy-

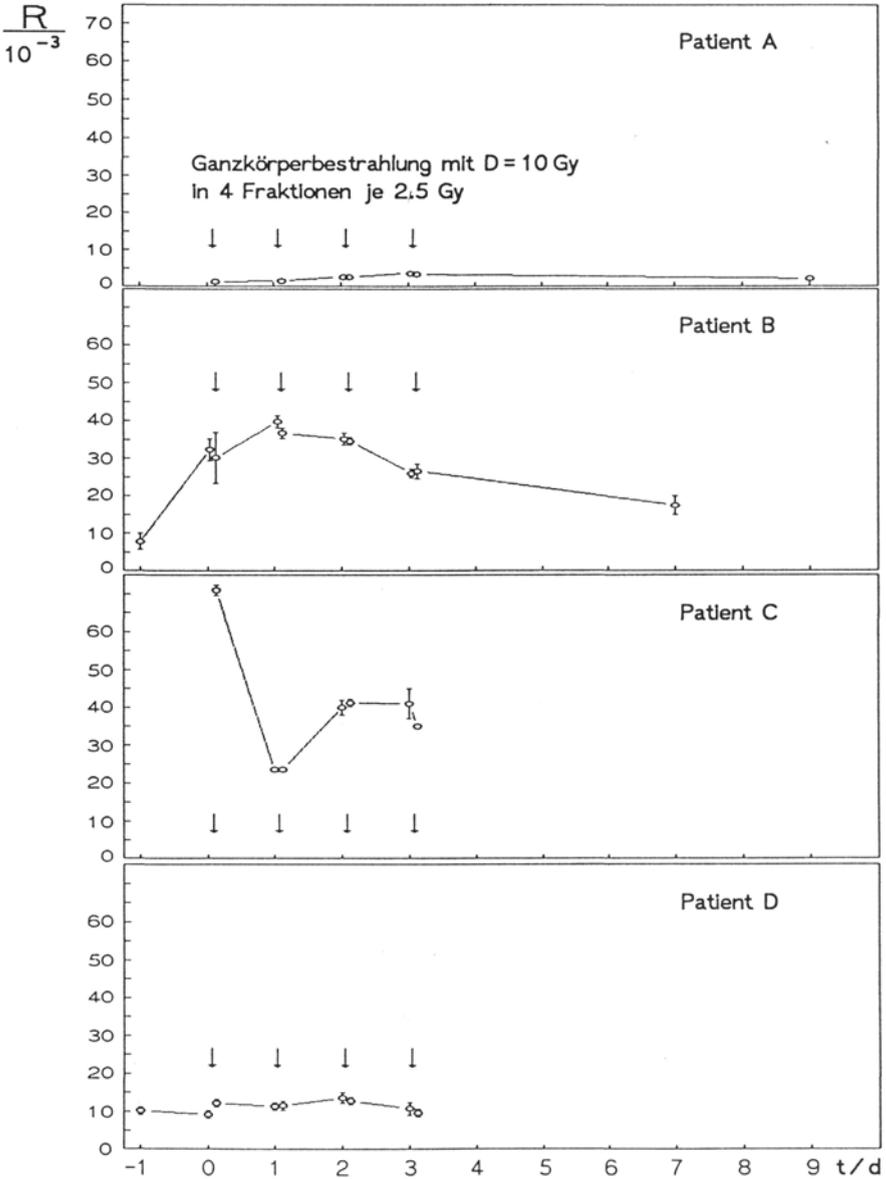


Abb. 11.39 Zeitlicher Verlauf des Retikulozytenwertes von Patienten während einer Ganzkörperbestrahlung. Die Patienten erhielten eine Ganzkörperdosis von D = 10 Gy in vier Fraktionen mit je 2,5 Gy an vier aufeinanderfolgenden Tagen. Die Bestrahlungstage sind durch Pfeile gekennzeichnet.

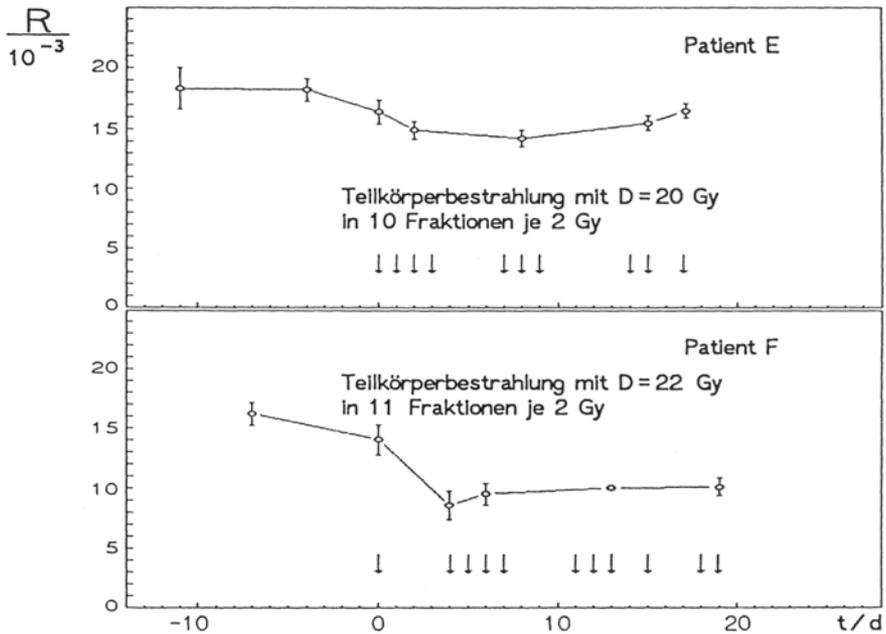


Abb. 11.40 Zeitlicher Verlauf des Retikulozytenwertes von Patienten während einer Teilkörperbestrahlung wobei etwa 50 % des Knochenmarks im Bestrahlungsfeld lag. Die Gesamtdosis wurde in Fraktionen von je 2 Gy gegeben. Die Bestrahlungstage sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Angaben zur Grunderkrankung und der Therapie der einzelnen Patienten

Patient A: Grunderkrankung: Chronisch myeloische Leukämie, Erstdiagnose: Nov. 86 zum Zeitpunkt der Transplantation sichere Zeichen der Akzeleration

Therapie: Hydroxyurea intermittierend seit Diagnosestellung unmittelbar vor Beginn der Konditionierung Eskalation der Therapie mit: 120 mg Thioguanin per os., 4 mg Vincristin-Sulfat i.V., 150 mg Prednison per os

Patient B: Grunderkrankung: Chronisch myeloische Leukämie, Erstdiagnose: Mai 88 Therapie: Hydroxyurea 1-1,5 g

Patient C: Grunderkrankung: Akute lymphatische Leukämie, Erstdiagnose: 1970 zum Zeitpunkt der Transplantation Vorliegen des vierten Rezidives

Therapie: multiple Chemotherapie, zuletzt ca. zwei Monate vor Bestrahlungsbeginn

Patient D: Grunderkrankung: Akute lymphatische Leukämie in 1. Vollremission, Erstdiagnose: Okt. 88. Therapie: Polychemotherapie

Patient E: Grunderkrankung: Morbus Hodgkin, Stadium Cs IA (lymphozyten- und histiozytenreiche Form), Lymphozytenextirpation (rechte Leiste)

Patient F: Grunderkrankung: Seminom, Stadium IV, Ablatio Testis (rechts), Zustand nach 4 Zyklen Chemotherapie (Cisplatin, Vesperid, Bleomycin)

tenwert gemessen. Auch Patient D, bei dem ebenfalls vor Bestrahlung eine Chemotherapie durchgeführt wurde, zeigte einen konstant niedrigen Retikulozytenwert. Bei Patient B stieg der Retikulozytenwert bis zum zweiten Bestrahlungstag zunächst steil an und zeigte danach einen konstanten Abfall. Bei Patient C wurde unmittelbar vor Bestrahlung ein sehr hoher Wert gemessen der nach 24 Stunden um etwa den Faktor 0,25 abfiel. Danach stieg der Retikulozytenwert wieder etwas an.

Bei den beiden teilkörperbetrahlten Patienten, E und F war zwar zunächst ein Abfallen des Retikulozytenwertes zu beobachten, jedoch sanken die Werte schon vor Bestrahlungsbeginn leicht ab. Die Abnahme der Retikulozytenwerte, die bei Patient F etwas stärker war, kann deshalb nicht unbedingt auf die Bestrahlung zurückgeführt werden, sondern zumindest zum Teil auf die begleitende Chemotherapie.

Ebenso wie die Ergebnisse anderer Autoren ist auch bei diesen Messungen kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Retikulozytenwert und der Bestrahlung zu erkennen. Mit der verwendeten durchflußzytometrischen Methode konnte der Retikulozytenwert mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Die Kurven zeigen deshalb einen glatten Verlauf und die Meßwerte der Blutentnahmen (Abb. 11.39) vor und nach der Bestrahlung zeigten nur geringe Unterschiede. Der zeitliche Verlauf der Retikulozytenwerte während und nach der Bestrahlung ist jedoch bei den einzelnen Patienten sehr unterschiedlich. Bei solchen Patienten liegt immer eine schwere Erkrankung vor, die im allgemeinen schon vor der Bestrahlung eine erhebliche Veränderung des Blutbildes zur Folge hat.

Möglichkeiten und Grenzen einer Dosisabschätzung beim Menschen

Vorbemerkung

Es sollen zunächst die aus den Tierexperimenten gewonnenen Ergebnisse für die relative Abnahme des Retikulozytenwertes mit den bisher von verschiedenen Autoren veröffentlichten Ergebnissen von Messungen bei Opfern von Strahlenunfällen und bei Patienten während einer therapeutischen Bestrahlung verglichen werden. Dieser Vergleich beschränkt sich auf Daten von Personen nach einer Ganzkörperbestrahlung mit einer Einzeldosis. Es stehen jedoch nur sehr wenige solcher Daten zur Verfügung.

In wenigen Fällen werden Ganzkörperbestrahlungen bei Leukämiepatienten zur Konditionierung vor einer Knochenmarktransplantation

durchgeführt. Dabei wird die Gesamtdosis von etwa 10 Gy im allgemeinen durch fraktionierte Bestrahlung an aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht, wobei die Dosis einer einzelnen Fraktion selten größer ist als 2,5 Gy. Meistens wird diese Therapie jedoch von einer Chemotherapie begleitet. Die Daten von diesen Patienten sind deshalb schwer zu interpretieren. Außerdem ist durch die Fraktionierung der Bestrahlung in mehrere kleinere Einzeldosen ein geringerer Effekt zu erwarten als bei der Bestrahlung mit einer entsprechend hohen Einzeldosis.

Die Daten von Messungen des Retikulozytenwertes nach Teilkörperbestrahlungen, wie sie häufig zur Tumorthherapie eingesetzt wird, sollen bei diesem Vergleich nicht berücksichtigt werden, da auch hier die zu erwartenden Effekte auf das blutbildende System erheblich geringer sind als nach einer Ganzkörperbestrahlung.

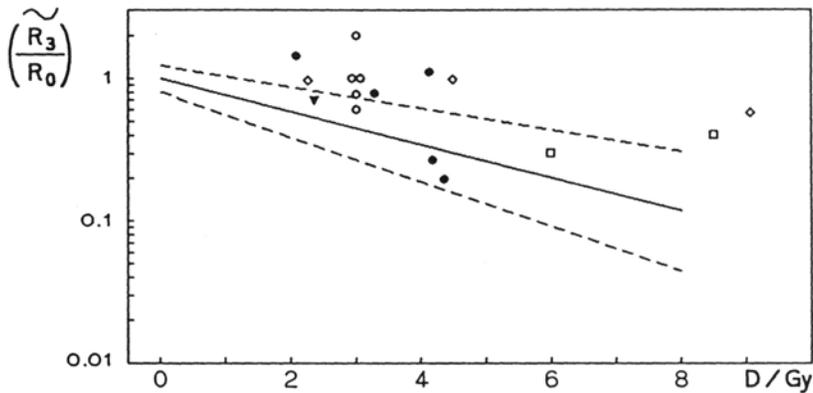


Abb. II.41 Relative Abnahme der Retikulozytenwerte am dritten Tag nach Bestrahlung als Funktion der Dosis. Vergleich der aus den Tierexperimenten gewonnenen Ergebnisse mit Daten die beim Menschen gemessen wurden. Die durchgezogene Gerade repräsentiert die Ergebnisse der Ganzkörperbestrahlungen der Kaninchen, die gestrichelten Linien kennzeichnen den Streubereich für 95 % der Werte.

Die einzelnen Symbole kennzeichnen die Daten verschiedener Autoren:

- Unfallopfer von Oak-Ridge Ganzkörperdosis ca. $D = 2,4-3,5$ Gy (Neutronen und γ -Strahlung unterschiedlicher Energien). Andrews 1962, Flidner, 1960, 1962
- Unfallopfer von Vinca (Neutronen und γ -Strahlung, unterschiedlicher Energien), Andrews 1962, Flidner, 1960, 1962
- ▼ gemittelte Werte von 3 Patienten nach Ganzkörperbestrahlung mit $D = 2,0-2,5$ Gy (250 kV-Röntgen). Dealy und Tubiana, 1964
- Daten von Leukämie-Patienten nach Ganzkörperbestrahlung (γ -Strahlung, ^{60}Co), Mathé et al., 1964
- ◇ Daten von Patienten nach Ganzkörperbestrahlung (γ -Strahlung, ^{60}Co), McFarland und Pierson, 1963.

Abb. 11.41 zeigt die relative Abnahme der Retikulozytenwerte beim Menschen als Funktion der Dosis. Die Werte wurden aus den Daten verschiedener Autoren errechnet. Die einzelnen Symbole kennzeichnen die jeweiligen Quellen (siehe Legende zu Abb. 11.41). Bei allen Personen handelt es sich um Ganzkörperbestrahlungen mit einer Einzeldosis. Im Vergleich dazu sind die Ergebnisse der relativen Abnahme der Retikulozytenwerte von Kaninchen am dritten Tag nach Ganzkörperbestrahlung aufgetragen. Bei den Tierexperimenten nahm der Median der relativen Werte mit Gleichung: $R3/R0 = e^{-0,28 D}$ als Funktion der Dosis ab (durchgezogene Gerade). Die Streuung der relativen Werte nahm als Funktion der Dosis zu. Die gestrichelten Linien kennzeichnen den Streubereich für 95 % der Werte. Auch beim Menschen nimmt der relative Retikulozytenwert am dritten Tag nach Bestrahlung als Funktion der Dosis ab. Bei den gezeigten Daten ist diese Abnahme jedoch etwas geringer als bei den Kaninchen.

Die bei Stahlenunfällen verunglückten Personen wurden meist mit verschiedenen Strahlenarten mit unterschiedlicher Energie und Strahlenqualität bestrahlt. Die Abschätzung der Ortsdosis und die Angabe einer entsprechenden Äquivalentdosis ist deshalb schwierig und oft mit einer großen Unsicherheit behaftet. So unterscheiden sich beispielsweise Angaben der einzelnen beteiligten Arbeitsgruppen über die Dosis für einige der in Vinca verunglückten Personen um den Faktor 2 bis 3 (Andrews, 1972). Außerdem kann bei diesen Personen im allgemeinen nicht von einer homogenen Ganzkörperbestrahlung ausgegangen werden.

Für Patienten während einer therapeutischen Bestrahlung sind zwar genaue Informationen über Dosis, Strahlenqualität und Bestrahlungsfeld vorhanden, jedoch interferieren hier die Effekte der Strahlenwirkung stark mit begleitenden therapeutischen Maßnahmen (Chemotherapie) und Effekten der Erkrankung selbst.

Bei den gezeigten Daten ist keine eindeutige Beziehung zwischen der physikalisch gemessenen oder abgeschätzten Dosis und der Abnahme des Retikulozytenwertes zu erkennen. Berücksichtigt man die große Unsicherheit der beim Menschen gemessenen Daten, liegen diese noch innerhalb der Streuung der bei den Kaninchen gemessenen relativen Abnahme des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung.

Aus den genannten Gründen ist es nicht möglich, aus den für den Menschen nach Bestrahlung vorliegenden Daten eine brauchbare Dosis-Effekt-Kurve zu bestimmen. Es kann daher nur auf die unter standardisierten Bedingungen gewonnenen Ergebnissen der Tierexperimente zurückgegriffen werden. Im nächsten Kapitel wird mit Hilfe dieser Ergebnisse ein Verfahren zur Dosisabschätzung beim Menschen vorgeschlagen und seine Genauigkeit angegeben.

Dosisabschätzung beim Menschen

Allgemeine Berechnung

Die Tierexperimente zeigten, daß eine Dosisabschätzung mittels Bestimmung der relativen Abnahme des Retikulozytenwertes beim Kaninchen durch zwei Messungen – einer unmittelbar nach Bestrahlung und einer nach drei Tagen – mit einer Nachweisgrenze von etwa 2,3 Gy prinzipiell möglich ist. Da vergleichbare Daten für die relative Abnahme des Retikulozytenwertes beim Menschen nach Bestrahlung bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vorliegen, sollen die im Tierexperiment gewonnenen Ergebnisse und die Ergebnisse der Messungen der Variation des Retikulozytenwertes bei gesunden Personen dazu verwendet werden, die Nachweisgrenze und die Genauigkeit einer solchen Dosimetrie abzuschätzen.

Im folgenden wird von der Annahme ausgegangen, daß die Strahlenwirkung auf das haematopoetische System beim Menschen die gleiche ist wie beim Kaninchen. Bei der Bestrahlung eines gesunden Menschen wäre dann die gleiche relative Abnahme des Retikulozytenwertes zu erwarten wie beim Kaninchen (Gleichung: 11.20). Die Dosis-Effekt-Kurve hat dann die Gleichung:

$$R_3(D)/R_0 = e^{-0,28 D} \quad (\text{II.22})$$

Es wird außerdem angenommen, daß die Variation der Strahlenempfindlichkeit beim Menschen die gleiche ist, wie sie bei den Tierexperimenten beobachtet wurde (Gleichung: 11.21). Der Streufaktor der relativen Abnahme nimmt dann nach folgender Gleichung mit der Dosis zu:

$$S_f(D) = S_f(0) \times e^{0,048 D} \quad (\text{II.23})$$

Dabei ist $S_f(0)$ der Streufaktor der intra-individuellen Variation des Retikulozytenwertes der betroffenen Person vor Bestrahlung. Dieser ist von dem beobachteten Zeitraum abhängig und bei einzelnen Personen etwas unterschiedlich. Bei 12 gesunden Probanden wurde für einen Zeitraum von 5 Tagen eine mittlere Schwankung des Retikulozytenwertes von $S_f = 1,11 \pm 0,03$ gemessen. Bei den Kaninchen wurde innerhalb des gleichen Zeitraumes etwa die gleiche Streuung beobachtet ($S_f = 1,10 \pm 0,03$).

Mit diesen Annahmen lassen sich Wahrscheinlichkeitsverteilungen für den Retikulozytenwert am dritten Tag nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen berechnen, wie sie beim Menschen zu erwarten wären. In Abb. 11.42 sind drei Beispiele solcher Verteilungen für verschiedene Personen (A, D und H, siehe Tab. II.8) und Ganzkörperdosen von $D = 0, 2, 4$ und 8 Gy dargestellt. Wenn die Abnahme des Reti-

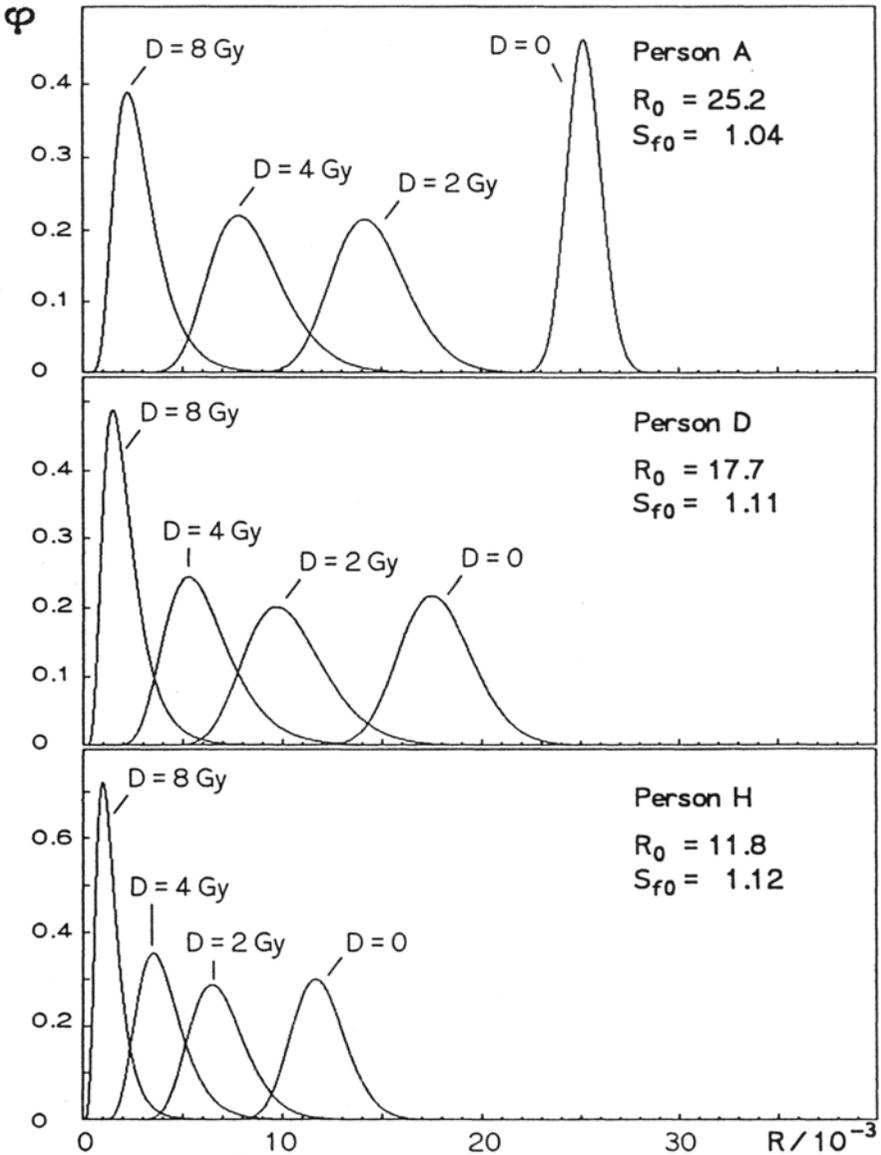


Abb. 11.42 Beispiele für Verteilungen wie sie am dritten Tag nach Ganzkörperbestrahlung beim Menschen zu erwarten wären. Als Grundlage für die Berechnung wurden die Ergebnisse der Tierexperimente und der Bestimmung der intra-individuellen Variation des Retikulozytenwertes bei gesunden Personen verwendet.

kulozytenwertes innerhalb drei Tagen nach Bestrahlung gemessen wird, hängt die Genauigkeit einer Dosisabschätzung im wesentlichen von der intra-individuellen Variation des Retikulozytenwertes bei der betreffen-

den Person über den gleichen Zeitraum ab. Bei Person A, wurde innerhalb einer Woche ein Streufaktor von $S_{f0} = 1,04$ gemessen und die entsprechende Verteilung der Wahrscheinlichkeitsdichte des Retikulozytenwertes berechnet. Wegen der in die Berechnung einbezogene Zunahme der Streuung des Retikulozytenwertes nach Bestrahlung (Gleichung: 11.23) verbreitern sich die nach Bestrahlung zu erwartenden Verteilungen. Eine Ganzkörperdosis von 2 Gy wäre bei dieser Person noch gut zu erkennen, da die Verteilungen für $D = 0$ Gy und $D = 2$ Gy noch deutlich voneinander getrennt sind. Erst bei höheren Dosen ($D = 4$ und 8 Gy) überlappen die Verteilungen und eine Unterscheidung zwischen den jeweiligen Dosen wird schwieriger.

Bei den anderen Personen war die gemessene Streuung des Retikulozytenwertes etwas größer (bei D: $S_{f0} = 1,11$ und bei H: $S_{f0} = 1,12$). Die für die einzelnen Dosen berechneten Verteilungen überlappen daher etwas mehr. Die Dosis kann bei diese Personen daher nur mit einer geringeren Genauigkeit abgeschätzt werden.

Unabhängig vom Retikulozytenwert, der bei beiden Personen unterschiedlich war, überlappen die Verteilungen für die einzelnen Dosen in gleichem Maße. Wie stark sich die Verteilungen überschneiden, hängt nur von der vorgegebenen intra-individuellen Variation des Retikulozytenwertes vor Bestrahlung ab. Diese Variation ist allerdings bei Personen mit hohem Retikulozytenwert meistens etwas geringer.

Da die Streuung des Retikulozytenwertes vor einer Bestrahlung für Personen im Katastrophenfall im allgemeinen nicht bekannt ist, wird im folgenden von einem mittleren, bei 12 gesunden Personen für einen Zeitraum von 5 Tagen bestimmten Streufaktor $S_{f0} = 1,11$ ausgegangen. Dieser Wert entspricht etwa dem der bei Kaninchen innerhalb des gleichen Zeitraumes gemessen wurde ($S_{f0} = 1,10$). Unter den genannten Voraussetzungen sollten sich daher für den Menschen die gleichen Ergebnisse für die Nachweisgrenze und die Genauigkeit einer Dosisabschätzung wie im Tierexperiment ergeben. Wie oben gezeigt, spielt der unterschiedliche Retikulozytenwert ($R_{\text{Mensch}} = 15,6 \times 10^{-3}$, $R_{\text{Kaninchen}} = 25,1 \times 10^{-3}$) bei Mensch und Kaninchen dabei keine Rolle.

Die Wahrscheinlichkeitsdichte $\varphi (R_3/R_0, D)$ ist eine Funktion der relativen Abnahme des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung R_3/R_0 und der Dosis D . Für einen bestimmten Wert für R_3/R_0 , der bei einer Person nach Bestrahlung mit einer unbekanntem Dosis gemessen wurde, kann die Wahrscheinlichkeit für verschiedene Dosisbereich angegeben werden, innerhalb der die unbekanntem Dosis liegt. Anhand der nächsten beiden Abbildungen soll die Berechnung dieser Wahrscheinlichkeit P aus der Verteilung der Wahrscheinlichkeitsdichte φ genauer erläutert werden.

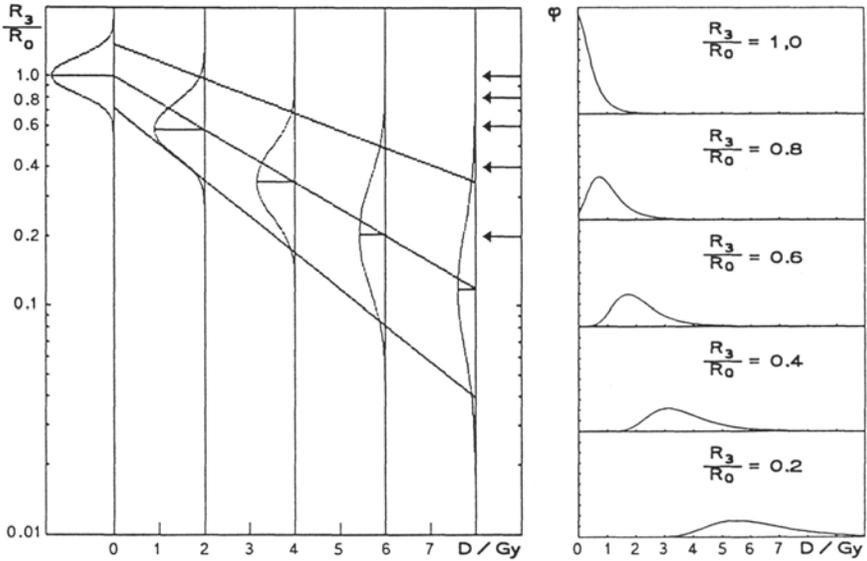


Abb. II.43 a Zur Erläuterung der Berechnung der Wahrscheinlichkeit P aus der Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung $\varphi (R_3/R_0, D)$.

Die Grafik links in Abb. 11.43a zeigt die erwartete exponentielle Abnahme des Retikulozytenwertes am dritten Tag nach Bestrahlung als Funktion der Dosis. Für die Dosen $D = 0, 2, 4, 6$ und 8 Gy sind die entsprechenden Verteilungen eingezeichnet. Da R_3/R_0 logarithmisch dargestellt ist, sind die Verteilungen symmetrisch zum Verlauf des Medians (mittlere Gerade). Die beiden äußeren Geraden kennzeichnen die Grenzen des 95 % Vertrauensbereiches. Die Oberfläche der Wahrscheinlichkeitsdichte $\varphi (R_3/R_0, D)$ beschreibt in der von R_3/R_0 und D aufgespannten Ebene einen „Tunnel“, der sich mit zunehmender Dosis D und abnehmendem R_3/R_0 verbreitert und flach ausläuft. Für konstante Werte für R_3/R_0 können Verteilungen berechnet werden, wie sie in der Abbildung rechts dargestellt sind. Diese Verteilungen entsprechen jeweils dem Schnitt in Richtung der Pfeile durch den links angedeuteten „Tunnel“. Für einen bestimmten Wert von R_3/R_0 kann die Wahrscheinlichkeit für beliebige Dosisbereiche durch Integration der Verteilung über die entsprechenden Grenzen berechnet werden. In dem in Abb. II.43b gezeigten Beispiel liegt die unbekannte Dosis bei einem Wert $R_3/R_0 = 0,4$ mit der Wahrscheinlichkeit $P = 0,68$ im Intervall $0 < D < 4$ Gy.

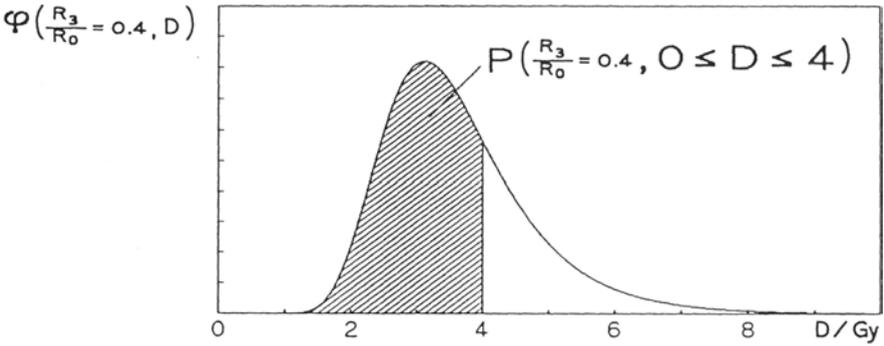


Abb. II.43b Zur Erläuterung der Berechnung der Wahrscheinlichkeit P aus der Wahrscheinlichkeitsdichte Verteilung $\varphi(R_3/R_0, D)$. Die schraffierte Fläche unter der Verteilung $\varphi(R_3/R_0 = 0,4, D)$ stellt die Wahrscheinlichkeit für den Dosisbereich $0 < D < 4$ Gy dar. Die gesamte Fläche unter der Kurve ist gleich 1.

In Abb. 11.44 ist die Wahrscheinlichkeit für verschiedene Dosisbereiche als Funktion der relativen Abnahme des Retikulozytenwertes R_3/R_0 am dritten Tag nach Bestrahlung dargestellt. Die einzelnen Kurven in der Grafik entsprechen den Intervallen von $D = 0$ Gy bis zu der jeweils angegebenen größten Dosis $D = 1$ bis 10 Gy. Eine Person, deren relativer Retikulozytenwert am dritten Tag nach Bestrahlung auf den Wert $R_3/R_0 = 0,68$ abgenommen hat, wurde mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,95$ mit einer Dosis von weniger als $D_{\max} = 3$ Gy bestrahlt

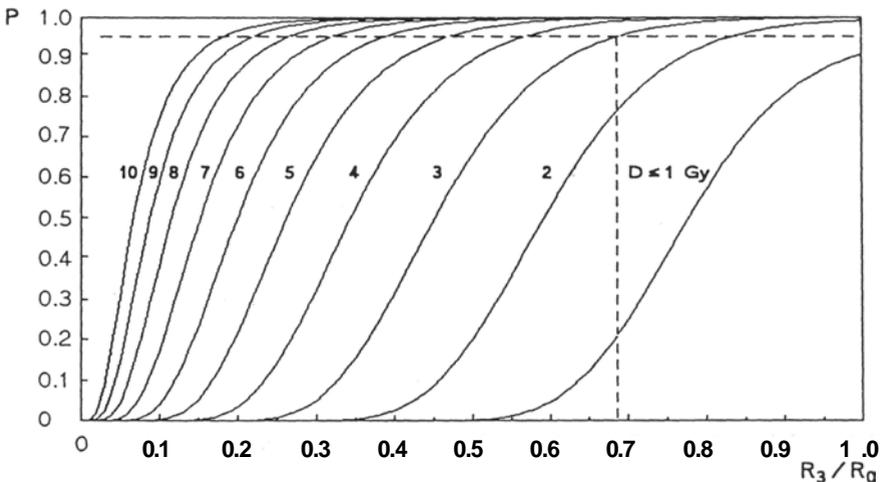


Abb. 11.44 Wahrscheinlichkeit P für verschiedene Dosisbereiche als Funktion der relativen Abnahme des Retikulozytenwertes R_3/R_0 am dritten Tag nach Bestrahlung. Die einzelnen Kurven in der Grafik entsprechen den Intervallen von $D = 0$ bis zu der jeweils angegebenen größten Dosis $D = 1$ bis 10 Gy.

(siehe gestrichelte Linie in der Grafik). Mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,99$ ist die unbekannte Dosis bei der selben Person geringer als $D_{\max} = 4 \text{ Gy}$ und mit einer Wahrscheinlichkeit $P = 0,75$ geringer als $D_{\max} = 2 \text{ Gy}$.

Dosisabschätzung für eine Sichtung im Katastrophenfall

Eine Strahlenexposition führt je nach Höhe der Strahlendosis in verschiedenen Organen des Menschen zu akuten Strahlenschäden. Diese Schäden äußern sich innerhalb Stunden bis einigen Tagen nach Bestrahlung durch eine Reihe unterschiedlicher Symptome. In Abb. 11.45 ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Übelkeit und Erbrechen (Strahlenkrankheit) und den Strahlentod durch Schädigung von Knochenmark, Darmgewebe und Gehirn nach einer kurzzeitigen Ganzkörperbestrahlung des Menschen als Funktion der Dosis dargestellt. Ab einer Ganzkörperdosis von etwa 1 Gy kommt es zu Übelkeit und mit zunehmender Dosis zu häufigerem Erbrechen (siehe auch Tab. 11.12). Eine Ganzkörperdosis von weniger als etwa 3 Gy ist nicht unmittelbar lebensbedrohlich; der Körper wird sich im allgemeinen auch ohne ärztliche Behandlung wieder erholen.

Das empfindlichste Organ des menschlichen Körpers in dieser Hinsicht ist das Knochenmark. Eine Ganzkörperdosis von mehr als 3 Gy führt

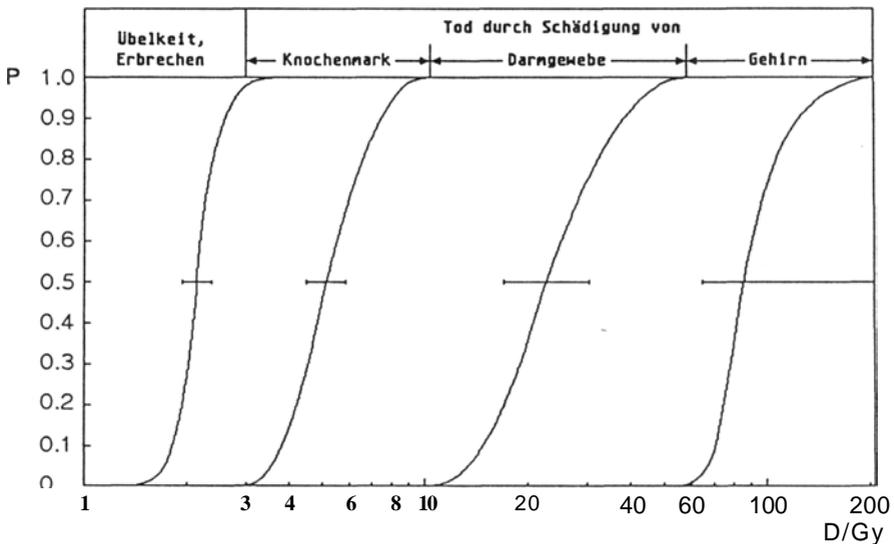


Abb. 11.45 Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Strahlenkrankheit und den Strahlentod durch Schädigung des Knochenmarks des Darmgewebes und des Gehirns als Funktion der Dosis, (nach Pohlitz, 1981).

wegen der Zerstörung der Stammzellen im Knochenmark zu einer Hemmung der Blutbildung. Bei 5 Gy ist die Mortalität etwa 0,5, bei 10 Gy besteht ohne ärztliche Behandlung kaum noch eine Chance zum Überleben. Personen, die eine Strahlendosis dieser Höhe erhalten haben, sterben innerhalb von 30 Tagen, wenn keine Therapie (Knochenmark-Transplantation) erfolgt.

Eine Ganzkörperdosis von mehr als 10 Gy führt zusätzlich zu Schädigungen des Darmgewebes. Beim gesunden Menschen wird das Darmepithel durch ständige Proliferation der Zellen fortwährend erneuert. Durch die Hemmung der Proliferation der Darmepithelzellen, und damit des Zelnachschubs, wird das Bindegewebe der Darmzotten freigelegt. Die Folge sind Resorptionsstörungen und Störungen des Wasserhaushaltes. Durch das Eindringen von Bakterien und Toxinen werden Entzündungen und Vergiftungen hervorgerufen. Diese Schäden führen nach etwa 5 Tagen zum Tod.

Ab einer Dosis von mehr als 50 Gy kommt es zu einer Schädigung der Gehirnzellen. Der Tod tritt dann innerhalb von Minuten ein.

In Tab. 11.12 ist die Symptomatik dieser akuten Strahlenschäden beim Menschen nach einer kurzzeitigen Ganzkörperbestrahlung für verschiedene Dosisbereiche zusammengefaßt. Die Frühsymptome, die nach einer Strahlenexposition innerhalb der angegebenen Dosisbereiche zu beobachten sind, bilden bisher zusammen mit einigen Blutwerten (Lymphozytenzahl und Leukozytenzahl) die Grundlage zur Abschätzung der Dosis bzw. der akuten Strahlenschäden beim Menschen. Die Entscheidung, ob eine Person in ein Krankenhaus eingewiesen wird, richtet sich im wesentlichen danach, welche dieser Symptome bei dem Betroffenen beobachtet werden.

In den Dosisbereichen, in denen therapeutische Maßnahmen noch möglich sind, entwickelt sich das akute Strahlensyndrom jedoch nur langsam und die Symptomatik ist daher unmittelbar nach Strahlenexposition wenig ausgeprägt. Außerdem können einige der aufgeführten Symptome wie Abgeschlagenheit, Übelkeit, Erbrechen oder Kopfschmerzen auch psychogen verursacht werden. Eine frühzeitige Dosisabschätzung aufgrund der Messung einer biologischen Größe wäre deshalb für die Entscheidung über die notwendige klinische Versorgung strahlenexponierter Personen von großem Vorteil.

Nach einer Strahleneinwirkung, bei der eine große Zahl von Menschen einer unbekanntem Strahlendosis ausgesetzt war, kann die relative Abnahme des Retikulozytenwertes bei einzelnen Personen schnell und mit guter Genauigkeit bestimmt werden. Dazu sind zwei durchflußzytometrische Messungen notwendig, eine Messung unmittelbar nach

Tabelle 11.12 Klinische Frühsymptomatik nicht stochastischer Strahleneinwirkung beim Menschen nach akuter kurzzeitiger Ganzkörperbestrahlung (Aus: Rahmenempfehlungen für den Katastrophenschutz in der Umgebung kerntechnischer Anlage, Bundesminister für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, 1989).

Kriterium	Bereiche					
	0,1–0,3 Gy	0,3–1 Gy	1–3 Gy	3–6 Gy	6–10 Gy	über 10 Gy
Ganzkörperdosis	0,1–0,3 Gy	0,3–1 Gy	1–3 Gy	3–6 Gy	6–10 Gy	über 10 Gy
Strahlensyndrom	keines	vereinzelt-leicht	leicht-mittel	mittel-schwer	äußerst-schwer	lebensbedrohlich
Prognose: ohne Behandlung	sehr gut	sehr gut	gut	unsicher	infaust, geringe Überlebenschance	infaust, keine Überlebenschance
mit symptomatischer Behandlung	sehr gut	sehr gut	sehr gut	gut	unsicher	infaust
Frühsymptome: Abgeschlagenheit	keine	vereinzelt leicht	mäßig	ausgeprägt	stark ausgeprägt	sehr schnell stark ausgeprägt
Übelkeit, Erbrechen Zeit nach Exp.	keine	vereinzelt 2–6 h	1–mehrmals 2–6 h	mehrmals stark 0,5–2 h	häufig stark ab 10 min	unstillbar ab 5 min
Kopfschmerz	keiner	keiner	kurzzeitig	ständig	ständig bohrend	quälend
Bewußtsein	klar	klar	klar	klar	getrübt	benommen
Körpertemperatur	normal	normal	normal	normal/subfebril	subfebril	subfebril/febril
Früherythem Zeit nach Exp.	keines	keines	leicht 12–24 h	6–12 h	1–6 h	1–6 h
sklerale Injektion Zeit nach Exp.	keine	keine	leicht 48 h	3–6 h	1–6 h	1–6 h
Dazugehörige hämatologische Labordiagnostik						
Blutwerte:						
Lymphozyten/ μ Zeit nach Exp.	> 1000 2–72 h	< 1000 2–24 h	< 800 2–24 h	< 600 2–24 h	< 300 2–6 h	0 6 h
Leukozyten/ μ nach 4–7 Tagen	4000–8000	< 4000	< 3000	< 1000	< 500	< 100

Bestrahlung und eine Messung nach drei Tagen. Die unbekannte Strahlendosis kann aus den gemessenen Werten abgeschätzt und bereits drei Tage nach der Strahleneinwirkung eine Entscheidung über eine weitere klinische Versorgung der einzelnen Personen getroffen werden.

Wenn eine Person möglicherweise mit einer Dosis von mehr als 3 Gy bestrahlt wurde, ist die Einweisung in ein Krankenhaus angezeigt und eine weitere Beobachtung erforderlich. Aus Abb. 11.44 läßt sich erken-

nen, daß dies der Fall ist, wenn bei dem Betroffenen der Retikulozytenwert drei Tage nach Bestrahlung um mehr als den Faktor $R_3/R_0 = 0,68$ abgenommen hat (gestrichelte Linie). Dabei wird von einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P_i = 0,05$ ausgegangen. Dies bedeutet, das 5 % der beurteilten Personen bei diesem Kriterium doch Strahlendosen erhalten haben können, die über 3 Gy liegen.

In Abb. 11.46 ist angegeben, daß von diesen insgesamt 5 % der fehlgeordneten Personen 4 % eine Dosis zwischen 3 und 4 Gy und nur 1 % eine Dosis zwischen 4 und 5 Gy erhalten haben können. Durch einen Vergleich mit Abb. 11.45 erkennt man, daß bei diesen Dosen mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,05$ ($D = 3-4$ Gy) und $P = 0,30$ ($D = 4-5$ Gy) mit dem Eintreten einer möglichen letalen Wirkung zu rechnen ist. Der effektive Fehler dieser Beurteilung liegt bei diesem Kriterium deshalb bei etwa 0,5 %. Von dem Anteil der Personen, die als gefährdet klassifiziert wurden, liegen 76 % in dem Dosisbereich von 0 bis 2 Gy, in dem nach Tab. 11.12 ohne Behandlung eine sehr gute Prognose besteht.

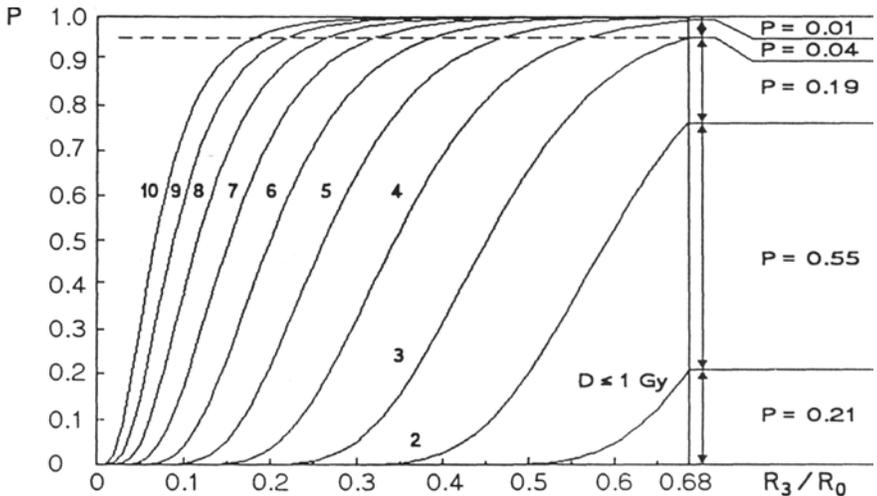


Abb. 11.46 Beispiel für die Ermittlung der Wahrscheinlichkeiten $P(D_{\min} \leq D \leq D_{\max})$ für entsprechende Dosisbereiche bei dem kritischen Wert $R_3/R_0 = 0,68$.

Mit der vorgeschlagenen Methode zur Biologischen Dosimetrie mittels der durchflußzytometrischen Bestimmung der relativen Abnahme des Retikulozytenwertes ist eine Sichtung einer großen Zahl von strahlenexponierten Personen mit ausreichender Sicherheit möglich. Bei den einzelnen Betroffenen kann bereits drei Tage nach einer Strahlenexposition eine Entscheidung getroffen werden, ob eine stationäre Aufnahme in eine Klinik und eine weitere Beobachtung notwendig ist.

Geeignete Durchflußzytometer stehen in vielen Forschungseinrichtungen und zunehmend in den Kliniken zur Verfügung. Die genaue Bestimmung des Retikulozytenwertes einer Blutprobe ist mit dem Durchflußzytometer in *weniger als 5 Minuten* möglich. Damit könnten an einem Gerät täglich mehrere hundert Messungen durchgeführt werden. Dabei ist gleichzeitig die Erfassung der Konzentrationen anderer Blutzellen (Lymphozyten, Thrombozyten) möglich, die im Zweifelsfall, zur Bestätigung oder Korrektur der Dosisabschätzung, herangezogen werden können.

Die vorgeschlagene Methode zur Biologischen Dosimetrie für eine Sichtung im Katastrophenfall soll im folgenden kurz zusammengefaßt werden:

Empfehlung für eine Sichtung im Katastrophenfall:

- 0-8 Stunden nach Strahleneinwirkung:

Messung des Retikulozytenwertes R_0

- 3 Tage nach Strahleneinwirkung:

Messung des Retikulozytenwertes R_3

Wenn $R_3/R_0 < 0,7$ ist, soll eine stationäre Aufnahme des Betroffenen in ein Krankenhaus veranlaßt werden. Die Daten für R_3 und R_0 sind dem behandelnden Arzt mitzuteilen.

Es ist damit zu rechnen, daß die übrigen Personen, die nicht in ein Krankenhaus eingewiesen werden, maximal in folgende Dosisbereiche fallen können:

1 %	4-5 Gy
4 %	3-4 Gy
19 %	2-3 Gy
55 %	1-2 Gy
21 %	weniger als 1 Gy

In diesen Populationen ist bei weniger als 1 % der Personen mit dem Auftreten von Symptomen zu rechnen, die eine Behandlung nötig machen.

Einschränkungen:

Durch eine Blutung, beispielsweise infolge einer Verletzung, kann es je nach Höhe des Blutverlustes zu einer Stimulierung der Erythropoese und einem Ansteigen der Retikulozytenwerte kommen. Geschieht dies innerhalb des Zeitraumes der Messungen von R_0 und R_3 , wird ein gegenüber Normalbedingungen erhöhter Wert R_3/R_0 gemessen. In diesem Fall würde daher eine zu geringe Strahlendosis geschätzt werden.

Personen, die einen starken Blutverlust hatten, sind gesondert zu beurteilen.

Dosisabschätzung für weitere therapeutische Maßnahmen in einer Klinik

Die notwendigen therapeutischen Maßnahmen richten sich im wesentlichen nach der Höhe der erhaltenen Strahlendosis und den daraus folgenden Strahlenschäden. Bei einer Dosis von etwa 3 bis 6 Gy werden noch genügend Stammzellen im Knochenmark überleben. Nach ausreichender Vermehrung dieser überlebenden Zellen wird sich das Knochenmark mit großer Wahrscheinlichkeit wieder regenerieren.

In diesem Dosisbereich nimmt jedoch die Konzentration von Leukozyten und Lymphozyten erheblich ab (siehe Tab. 11.12). Die Abwehrlage von strahlenexponierten Personen ist daher stark geschwächt. Eine selektive Behandlung mit Antibiotika bzw. eine Intensivpflege in Sterilbetten ist deshalb erforderlich. Außerdem kann eine Transfusions-therapie zur Substitution von Granulozyten, Thrombozyten oder Erythrozyten notwendig sein.

Von einer Dosis von etwa 6 bis 10 Gy an, ist mit einer selbständigen Regeneration des Knochenmarks nicht mehr zu rechnen, da dann praktisch sämtliche Stammzellen zerstört sind. In diesen Fällen ist daher eine Transfusion mit Knochenmark-Stammzellen eines kompatiblen Spenders erforderlich.

Aus dem gemessenen Wert R_3/R_0 und Abb. 11.44 kann die Wahrscheinlichkeit für die entsprechenden Dosisbereiche bzw. für das Eintreten von Strahlenschäden entnommen werden.

Eine Person, bei der ein Wert $R_3/R_0 = 0,38$ gemessen wurde, kann bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P = 0,95$ eine Dosis bis zu $D = 6$ Gy erhalten haben. Abb. 11.47 zeigt nochmals einen Ausschnitt von Abb. 11.44, wobei die einzelnen Wahrscheinlichkeiten $P(D_{\text{Min}} < D < D_{\text{Max}})$ für dieses Beispiel angegeben sind. Mit welcher Wahrscheinlichkeit diese Person mit einer Dosis von beispielsweise $D = 3$ bis 6 Gy bestrahlt wurde, kann ebenfalls anhand der Grafik abgeschätzt werden. In diesem Dosisbereich sind schwere Strahlenschäden zu erwarten und eine Intensivpflege notwendig (siehe Tab. 11.12 und Abb. 11.45).

Bei einem Wert $R_3/R_0 = 0,10$ ist die Strahlendosis mit einer Wahrscheinlichkeit $P_i = 0,95$ höher als $D = 6$ Gy. In diesem Fall ist damit zu rechnen, daß das Knochenmark der betroffenen Person nicht mehr zu einer spontanen Regeneration fähig ist; deshalb muß eine Knochenmark-Transplantation durchgeführt werden.

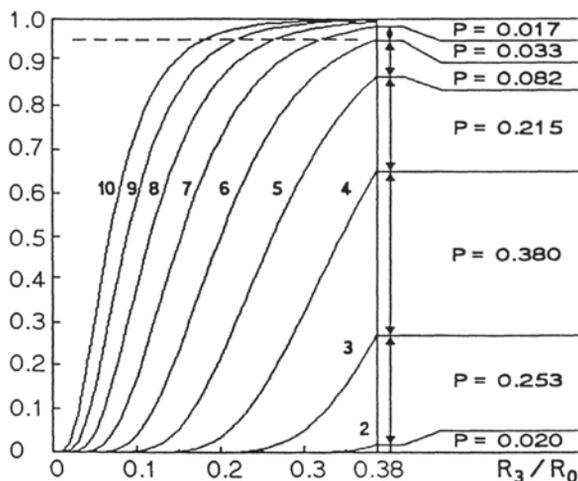


Abb. 11.47 Beispiel für die Abschätzung einer unbekanntem Strahlendosis bei einer Person, deren Retikulozytenwert drei Tage nach der Bestrahlung um den Wert $R_3/R_0 = 0,38$ abgenommen hat. Mit den angegebenen Wahrscheinlichkeiten P ($D_{\min} < D < D_{\max}$) ist die Person mit einer Strahlendosis innerhalb der entsprechenden Bereiche bestrahlt worden.

Es wurde bisher stets von einer kurzzeitigen homogenen Ganzkörperbestrahlung ausgegangen. Die Effekte nach einer Teilkörper- oder prothierten Bestrahlung werden aber geringer sein. Für den Verlauf der Strahlenkrankheit ist jedoch nicht die tatsächliche Strahlendosis, die der Betroffene erhalten hat, von Bedeutung, sondern deren Wirkung. Eine besondere Rolle spielt dabei die Wirkung auf das Knochenmark, dem empfindlichsten Organ des Menschen. Die Prognose des Krankheitsverlaufs bei einer strahlenexponierten Person hängt deshalb im wesentlichen davon ab, ob das Knochenmark noch zu einer selbständigen Regeneration fähig ist. Dies ist der Fall, wenn noch genügend überlebende Stammzellen vorhanden sind. Bei einer Teilkörperbestrahlung wird im allgemeinen nur ein Teil des Knochenmarks bestrahlt werden. Die Voraussetzungen für eine spontane Regeneration des Knochenmarks sind hier deshalb günstiger als bei einer Ganzkörperbestrahlung.

Diese Beispiele zeigen, daß die genaue Abschätzung der Strahlendosis und des Ausmaßes der Strahlenschädigung nicht möglich ist. Es können nur relativ breite Dosisbereiche angegeben werden, innerhalb derer die unbekanntem Strahlendosis mit den entsprechenden Wahrscheinlichkeiten liegt. Entscheidungen über therapeutische Maßnahmen in der Klinik werden sich deshalb auf die weitere Symptomatik der Strahlenkrankheit und eine Vielzahl von Labordaten, insbesondere auf den zeitlichen Verlauf der Konzentrationen der verschiedenen Blutzellen stützen.

Zusammenfassung

Mit der vorgeschlagenen Methode zur Biologischen Dosimetrie mit Hilfe einer automatischen Retikulozytenmessung kann bei einer großen Zahl strahlenexponierter Personen drei Tage nach der Strahlenexposition eine Entscheidung getroffen werden, ob eine Einweisung einzelner Personen in ein Krankenhaus notwendig ist:

Ist der Retikulozytenwert R_3/R_0 größer als 0,7, so ist eine Einweisung in ein Krankenhaus nicht notwendig.

Die in der Personengruppe erhaltene Strahlendosis ist dann kleiner als 3 Gy (bzw. 3 Sv). Etwa 4 % dieser Gruppe werden bei diesem Sichtungskriterium eine Strahlendosis zwischen 3 Gy und 4 Gy erhalten haben und etwa 1 % eine Strahlendosis zwischen 4 Gy und 5 Gy.

Ist der Retikulozytenwert R_3/R_0 kleiner als 0,7, so ist eine Einweisung in ein Krankenhaus notwendig.

Die ermittelten Werte müssen dem später behandelnden Arzt mitgeteilt werden und können als Grundlage für weitere klinische Entscheidungen dienen.

Darüber hinaus ist mit dieser Methode – wie auch mit allen anderen Methoden der Biologischen Dosimetrie – eine genauere Abschätzung der unbekanntem Strahlendosis wenige Tage nach der Bestrahlung nicht möglich. Es können nur Dosisbereiche angegeben werden, innerhalb derer die unbekanntem Strahlendosis mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit liegt. Für weitere Entscheidungen über die klinische Versorgung und notwendige therapeutische Maßnahmen sind daher zusätzliche Untersuchungen und eine weitere Beobachtung der Betroffenen erforderlich.

Literaturverzeichnis

Zitierte Literatur

- Ababei L, Filip M, Haller C, Moisin M: Einfluß von ionisierender Strahlen auf den Erythrozyten- und Retikulozytenstoffwechsel. *Folia Haemat.* 90:149-155,1968
- Andrews GA: Critically accidents in Vinca, Jugoslavia, and Oak Ridge, Tennessee. Comparison of radiation injuries and results of therapy. *J. Am. Med. Assoc.* 179: 191-197,1962
- Baldini M, Pannaccinulli I: The maturation rate of reticulocytes. *Blood* 15: 614-629,1960
- Barbier H: Über die Schwankungen der Retikulozytenzahlen im strömenden Blut und ihre Ursachen. *Klinische Wochenschrift*: 1496-1497,1939

- Begemann W, Rastetter J: Atlas der klinischen Hämatologie. 3. Auflg.
Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1978
- Belcher EH, Courtanay VC: Studies of ⁵⁹Fe-uptake by rat reticulocytes in vitro.
Brit. J. Haemat. 5: 268-277, 1959
- Boggs SS, Boggs DR, Walter MJ: Differing patterns of erythropoiesis following whole-body irradiation
Radiat. Res. 74: 312-322, 1978
- Carpaij WJM: Is the red cell a valuable radiation bioindicator? An Investigation of five
Parameters. Netherlands Energy Research Foundation ECN – 81-137 (Paper to be
presented at the 20th International Congress on Occupational Health, Cairo, Egypt,
25 Sept.-Oct., 1981)
- Cartwright GE: Diagnostic Laboratory Hematology,
4th Edition Grune & Stratton, New York – London 1968
- Chaudhuri JP, Metzger E, Messerschmidt O: Peripheral reticulocyte count as biologic
dosimetry of ionizing radiation. Experiments in the mouse.
Acta Radiol. Oncology 18: 155-160, 1979
- Chaudhuri JP, Messerschmidt O: Amount of peripheral reticulocytes as biologic dosi-
metry of ionizing radiation. Experiments in the rabbit.
Acta Radiol. Oncology 21: 177-179, 1982
- Chone B: Eisenutilisation nach Strahleneinwirkung.
Tierexperimentelle Voruntersuchungen. Nuclear Medizin 2: 21-34, 1961
- Clarke TD: Automated reticulocyte enumeration – Spectrum III
Poster at Cytometry in the clinical Laboratory,
Santa Barbara, April, 25,-30, 1982
- Dacie JV, and Lewis SM: Practical Haematology, Ed. 3, 28-32, Grune & Stratton,
New York, 1963
- Darzynkiewicz Z, Traganos T, Sharpless MR, Melamed MR: Thermal denaturation of
DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytometry.
Exp. Cell Res. 90: 411, 1975a
- Darzynkiewicz Z, Traganos T, Sharpless MR, Melamed MR: Conformation of RNA in
situ as studied by acridine orange staining and automatic cytometry.
Exp. Cell Res. 95, 143, 1975b
- Darzynkiewicz Z: Acridin Orange as a molecular probe in studies of nucleic acids in situ, in:
Flow cytometry and sorting, Ed.: Melamed MR, Mullaney RF, Mendelson ML,
John Wiley & Sons Inc., 1979
- Dawson MR: Osteology of *Prolagus sardus*, a quaternary ochotonid
(mammalia, lagomorpha). *Paläo verebrata* Bd. 2: 157-190, 1969
- Dealy JB jr, Tubiana M: Haematological response to inhomogeneous and homogeneous
whole-body irradiation. *Ann. NY Acad. Sci.* 114: 268-283, 1964
- Deiss A, Kurth D: Circulating reticulocytes in normal adults as determined by the new
methylene blue method. *Am. J. Clin. Path.* 53: 481-184, 1970
- Eder H, Thae A: Arbeiten zur Entwicklung einer neuen Retikulozytenzählmethode
zur Strahlenschadendiagnose bei nuklearen Katastrophen. Teil 1: Suche nach Ver-
fahren für den Nachweis oder die Bestimmung von Retikulozyten.
Forschungsbericht aus der Wehrmedizin FBWM 69-1, 1969

- Eder H, Fritsche H, Thaer A: Arbeiten zur Entwicklung einer neuen Retikulozyten-zählmethode zur Strahlenschadendiagnose bei nuklearen Katastrophen. Teil 2: Entwicklung der Bestimmungsmethode.
Forschungsbericht aus der Wehrmedizin FBWM 71-8, 1971
- Ederle W: Über Supravitalfärbung und Retikulozytenzählung.
Folia Haemat. 50: 15-20, 1933
- Egner HJ: Untersuchungen zur Zellkinetik nach Bestrahlung mit Hilfe von mehrpara-
metrischer Durchflußzytometrie und Acridin – Orange Färbung.
Diplomarbeit Fachbereich Physik, Univ. Frankfurt/M., 1982
- Engelbrecht HM, Remmele W: Der Einfluß von Erythropoietin und somatotropem
Hormon auf die Retikulozyten Reifungszeit in vitro.
Blut, Band XIX Heft 7; 385-393, 1969
- Eltgen D, Koch R, Langendorff H: Untersuchungen über einen biologischen Strahlen-
schutz. 38. Mitteilung: Der Einfluß von Cysteamin und Serotonin auf die Retikulozy-
ten und den Eisenstoffwechsel bestrahlter Tiere.
Strahlentherapie 114:118-127, 1961
- Fliedner TM: Zur Hämatologie des akuten Strahlensyndrom.
Strahlentherapie 112: 543-560, 1960
- Fliedner TM, Cronkite EP, Bond VP: Pathogenesis and regeneration of Radiation
induced bone marrow injury, and therapeutic implications
in: Strahlenwirkung und Milieu, Ed.: Fritz-Niggli, H, Urban & Schwarzenberg,
München, Berlin 1962
- Frankel S and Reitmann S (Edts): Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Dia-
gnostics. Ed. 6: 1132, C. V. Mosby, St. Louis, 1963
- Furlong BF: Interpreting the reticulocyte count.
Postgraduate Medicine Vol. 54 No. 4: 207-211, 1973
- Gilmer PR, Koepke JA: The reticulocyte. An approach to definition.
Am J. Clin. Path: 66: 262-267, 1967
- Glöbel B: Analyse von menschlichen Blutzellen zur Strahlenfrühdagnostik.
Forschungsbericht aus der Wehrmedizin, Homburg/Saar, 1988
- Heeren IG: Die Wirkung der diskontinuierlichen Röntgenbestrahlung auf die Retikulo-
zytenwerte der Maus, Strahlentherapie 77: 383-386, 1948
- Heilmeyer L, Oortgiese A: Verbesserte Methode zur gleichzeitigen Zählung von Reti-
kulozyten und Thrombozyten für die ärztliche Praxis.
Zentralblatt für innere Medizin 55: 737-740, 1934
- Heilmeyer L, Westhäuser R: Reifungsstudien an überlebenden Retikulozyten in vitro
und ihre Bedeutung für die Schätzung der täglichen Haemoglobinproduktion in vivo.
Z. Klin. Med. 121, 361-379, 1932
- Hennessy TG and Huff RL: Depression of tracer iron uptake curve in rat erythrocytes
following total body X – Irradiation.
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 73: 436, 1950
- Jacobberger JW, Horan PK, Hare JD: Flow cytometric analysis of blood cells stained
with the cyanine dye DiOC₁(3): Reticulocyte quantification
Cytometry 5: 589-600, 1984
- Jacobson LO: The hematologic effects of ionizing radiations.
In: A Hollaender (ed): Radiation Biology.
Mc Graw Hill, New York Vol. 1, part 2, 1026, 1954

- Jacobson LO, Marks EK: The hematological effects of ionizing radiations. *Radiology* 52, 371-395, 1949
- Kapuscinski J, Darzynkiewicz Z, Melamed MR: Luminescence of Solid Complexes of Acridin Orange with RNA. *Cytometry* Vol. 2 No. 4: 201-211, 1982
- Kosenow W: Lebende Blutzellen im Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskop. *Bibl. Haematol. Fase.* 4: 1-288, 1956
- Kosenow W and Mai H: Fluorescence microscopy of blood cells. *Z. Kinderheilkunde* 70: 552, 1952
- Krämer M: Untersuchungen zur Induktion von Chromosomenaberrationen und Mikrokernen mit durchflußzytometrischen Techniken und einer Immunofluoreszenzmethode zur Anfärbung von Kinetochoren
Dissertation Fachbereich Physik, Univ. Frankfurt/M., 1989
- Langendorff H: Das Verhalten der Retikulozyten der weißen Maus nach Röntgenbestrahlung 1. Teil: Die Wirkung einmalig verabreichter Strahlendosen. *Strahlentherapie* 55: 307-315, 1936
- Langendorff H: Das Verhalten der Retikulozyten der weißen Maus nach Röntgenbestrahlung 2. Teil: Die Wirkung einfach-fraktionierter Strahlendosen. *Strahlentherapie* 59: 652-661, 1937
- Langendorff H: Das Verhalten der Retikulozyten der weißen Maus nach Röntgenbestrahlung 3. Mitteilung. *Strahlentherapie* 62: 304-314, 1038
- Langendorff H und Reisner A: Untersuchungen über den Normalwert der Retikulozyten beim Menschen. *Folia Haemat.* 55: 88-92, 1936
- Lee LG, Chen CH, Chin LA: Thiazole Orange: A new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry* 7: 508-517, 1986
- Mac Kinney AA et al.: Ascertaining genetic carriers of hereditary spherocytosis by Statistical analysis of multiple laboratory tests. *J. Clin. Invest.* 41: 554-567, 1962
- Mardersteig K: Über die Wirkung der Röntgenstrahlen auf die Erythropoese. 1. Mitteilung: Der Einfluß von therapeutischen Röntgenbestrahlungen auf die Retikulozyten. *Strahlentherapie* 59: 607-642, 1937
- Mardersteig K: Über die Wirkung der Röntgenstrahlen auf die Erythropoese. 2. Mitteilung: Experimentelle Untersuchungen über die Retikulozyten nach Röntgenbestrahlung. *Strahlentherapie* 61:107-129, 1938
- Mathe G, Amiel L, Schwarzenberg L: Treatment of acute total – body Irradiation injury in man. *Ann. NY Acad. Sci.* 114: 368-392, 1964
- McFarland W, Pearson HA: Haematologic events as dosimeters in human total – body Irradiation. *Radiology* 80: 850, 1963
- Miale JB: *Laboratory Medicine – Hematology*. Ed. 3. C. V. Mosby, St. Louis, 1967
- Nizet A: Recherches sur la Physiopathologie des hematides IL
Acta Med. Scandinav. 124: 590-598, 1946
- Otto FJ: Biologische Wirkung schneller Neutronen. Retikulozytenzahl und Milzgewicht von Mäusen nach Ganzkörperbestrahlung.
Forschungsbericht aus der Wehrtechnik 73-24,1-20, 1973
- Page LB and Culver PJ: *A Syllabus of Laboratory Examinations in Clinical Diagnosis*. 12 Harvard University Press, Cambridge, 1960

- Peacocke AR: The interaction of acridines with nucleic acids.
in: The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Ed.: Weissberger A, Taylor EC, Vol. 9, Acridines Ed. Acheson RM, Verlag Interscience: 733, 1973
- Pohlit W.: Strahlendosis und Strahlenwirkung im Katastrophenfall,
in: Zivilschutz-Forschung, Band 13, 85-95, Osang-Verlag Bonn 1981
- Riggler R, Microfluorometric characterisation of intracellular nucleic and nucleoproteins by acridine orange. Acta Physiol. Scand. 67: suppl. 267, 1966
- Rode I, Horváth M, Petrányi J, Kiss B: Investigation of valuable biochemical indicator in radiotherapy. I. Immunological tests and reticulocyte number. Strahlentherapie 155: 387-391, 1979
- Sage BH, O'Connell JP, Mercolino TJ: A rapid vital staining procedure for flow cytometric analysis of human reticulocytes. Cytometry 4: 222-227, 1983
- Savage RA, Skoog DP, Rabinovitch A: Analytical inaccuracy and imprecision in reticulocyte counting: A preliminary report from college of American pathologists reticulocyte project. Blood cells 11: 7-112, 1985
- Schmidt S und Thews K: Physiologie, Springer, Berlin. 1960
- Schmitz FJ, Werner E: Optimisation of flow cytometric discrimination between reticulocytes and erythrocytes. Cytometry 7: 439-444, 1986
- Schmitz FJ, Werner E, Kaltwasser JP: Automated counting of reticulocytes by means of flow cytometry. Blut 51: 204, 1985
- Seip M: Reticulocyte studies. The liberation of red blood corpuscles from the bone marrow into the peripheral blood and the production of erythrocytes elucidated by reticulocyte investigations.
Acta Med. Scand. Suppl. 282, 1-164, 1953
- Seligman PA, Allen RH, Kirchanski SJ, Natale PJ: Automated analysis of reticulocytes using a fluorescent staining with both acridine orange and immunofluorescence technique. Am. J. Hematol. 14: 57-66, 1983
- Take HJ, Nieuwenhui IAB, Köper GJM, Slats JCM, Ploem JS:
Flow cytometry of human reticulocytes based on RNA fluorescence.
Cytometry 1: 313-320, 1980
- Tanke HJ Rathbarth PH, Vossen JMJJ, Köper GJM, Ploem JS:
Flow cytometry of reticulocytes applied to clinical hematology.
Blood 61:1091-1097, 1983
- Thaer A Becker H: Microscope fluorometric investigations on the reticulocyte maturation distribution as diagnostic criteria of disordered erythropoiesis. Blut 30: 339-348, 1975
- Theml H: Taschenatlas der Hämatologie:
Morphologische Diagnostik für die Praxis. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1983
- Trachtenberg F: Retikulozytenstudien. 1. Mitteilung: Zahl und Differenzierungsformel der Retikulozyten beim Normalen.
FoliaHaematol. 46:1-16, 1932
Strahlentherapie 130: 376-390, 1966
- Valet G: A new method for fast blood cell counting and partial differentiation by flow cytometry. Blut 49: 83-90, 1984
- Van Hove, L: Flow Cytometric Analysis of reticulocytes and platelets.
Poster at Becton Dickinson Immuno Cytometric Systems
III. European User's Meeting 5.-7. June, 1989, Ghent, Belgium

- Van Hove L, Goossens V, Van Duppen and Verwilghen RL: Reticulocyte count using thiazole orange, a flow cytometry method.
Poster at Becton Dickinson Immuno Cytometric Systems
III. European User's Meeting 5.-7. June, 1989, Ghent, Belgium
- Vander JB, Harris CA, Ellis S, R: Reticulocyte counts by means of fluorescence microscopy. *J. Lab. Clin. Med.* 62: 132-140, 1963
- Watson CJ: The erythrocyte coproporphyrin. Variation in respect to erythroporphyrin and reticulocytes in certain of the anemias. *Arch. Int. Med.* 86: 797, 1950
- Wintrobe MM: *Clinical Haematology*, Lea & Febiger, Philadelphia 1981

Weitere Literatur

1. Hämatologische Untersuchungen über Retikulozyten

- Cline MJ, Berlin NI: The Retikuloocyte count as an indicator of the rate of erythropoiesis. *Am. J. Clin. Pathol.* Vol. 39, No. 2: 121-128, 1963
- Coutelle R, Rapoport S: Der Einfluß von pH und Ionenmilieu auf die Aufnahme von Brillantkresylblau durch Kaninchen-Retikulozyten.
Fol. Haem. 74: 191-196, 1957
- Goldeck H, Siegel P: Die 24-Stunden-Periodik der Blutretikulozyten unter vegetativer Pharmaka. *Ärztl. Forsch.* 2, 245-248, 1948
- Langlois RG, Bigbee WL and Jensen RH: Measurement of frequency of human erythrocytes with gene expression loss phenotypes at the glycophorin A locus.
Hum Genet. 74: 355-362, 1986
- McKee LC, Johnson LE, Lange RD: Circadian Variation in reticulocyte counts and immuno-detectable erythropoietin titers
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145, 1284-1287, 1974
- Mel HC, Prenant M, Mohandas N: Reticulocyte Motility and Form: Studies on maturation and Classification Blood, Vol. 49, Nr. 6, 1001-1009, 1977
- Osgood EE, Wilhelm MM, Portland AB: Reticulocytes.
J. Lab. Clin Med 19: 1129-1135, 1934
- Stobbe H: Vergleichende Zählungen supravital gefärbter Retikulozyten und phasenoptisch erfaßbarer Erythrozyten mit Innenstrukturen.
Folia Heamat. 8 3, 194-197, 1965
- Tepperman AD, Curtis JE, McCulloch EA: Erythropoietic colonies in cultures of human marrow. *Blood* 44: 659-669, 1974

2. Hämatologische Untersuchungen über Strahlenwirkungen

- Ababei L, Filip M: NAD biosynthesis in rabbit erythrocytes and reticulocytes after whole-body-X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 19: 563-573, 1969
- Barcos M, Goldwasser E: The effect of radiation in vitro on erythropoietin action.
Radiat. Res. 66: 541-551, 1976
- Boggs SS, Boggs DR, Walter MJ: Differing patterns of erythropoiesis following whole-body Irradiation in W/W^v and SL/SL^d mice.
Radiat. Res. 74: 312-322, 1978

- Brairi H: Strahlenbelastung und Umwelteinflüsse.
Strahlenschutz in Forschung und Praxis 4: 357-371, 1964
- Chapman WH: The weight and mortality response of male and female mice in the lethal X-ray dose range. Radiat. Res. 2: 502-511, 1955
- Fochem K, Michalica W, Picha E: Tageszeitliche Unterschiede in der Strahlenwirkung bei Ratten. Strahlentherapie 128: 441-444, 1965
- Fochem K, Michalica W, Picha E: Zur Frage tagesrhythmischer Unterschiede in der Strahlensensibilität bei Tumormäusen und Vergleichstieren.
Strahlentherapie 130: 590-594, 1966
- Fochem K, Michalica W, Picha E: Tageszeitliche differente Strahlenwirkung bei Ratten mit Yoshidasarkom.
Strahlentherapie 132: 618-622, 1967
- Fochem K, Michalica W, Picha E: Über die pharmakologische Beeinflussung der tagesrhythmischen Unterschiede in der Strahlenwirkung und zur Frage der jahreszeitlich bedingten Unterschiede der Strahlensensibilität bei Ratten und Mäusen.
Strahlentherapie 133: 256-261, 1967
- Fochem K, Michalica W, Picha E: Über tagesrhythmischen und jahreszeitlichen Unterschiede der Strahlenwirkung bei Versuchstieren und die Möglichkeit einer pharmakologischen Beeinflussung. Strahlentherapie 135: 223-226, 1968
- Ganzoni AM: Die Bedeutung der Retikulozytenzahl für die Beurteilung einer Anämie
Dtsch. Med. Wschr. 95, 2291-2292, 1970
- Goodman R, Grate H, Hannon E, Hellman S: Haematopoietic Stem Cells: Effect of preirradiation, bleeding, and erythropoietin on thrombopoietic differentiation.
Blood, Vol. 49, No. 2, 253-261, 1977
- Griff in ED, Alpen EL: Iron utilisation in the rat exposed to low - dosage whole - body X-Irradiation. Radiat. Res. 3: 230, 1955
- Hageman GK, Janke T, Farahat FL, Hecker H: Dosisabhängigkeit reproduktiv letaler Zellschäden nach Röntgenbestrahlung oder Adriamycin-Exposition mit niedrigen Dosen. Strahlentherapie 158, Nr. 1, 55-60, 1982
- Hellmann S, Grate HE, Chaffey JT: Effects of radiation on the capacity of the stem cell compartment to differentiate into granulocytic and erythrocytic progeny.
Blood 34: 141-156, 1969
- Horvath M, Geszti O, Benedek E, Farkas J, Reischl G: Investigation of a valuable biochemical indicator in radiotherapy II. Plasma free hemoglobin and haptoglobin level changes. Strahlentherapie 155: 579-583, 1979
- Hulse EV: Quantitative studies on the depletion of the erythropoietic cells in the bone marrow of the irradiated rat. Br. J. Haematol 3: 348, 1957
- Jacobberger JW, Horan PK, Hare JD: Flow cytometric analysis of blood cells
- Jacobson LO, Marks EK, Gastron EO, Robson M, Zirkle RE:
The role of the spleen in radiation injury.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med 70: 740-742, 1949
- Koch R, Seiter I: Untersuchungen über einen biologischen Strahlenschutz. 52. Mitteilung: Der Einfluß von Strahlenschutzstoffen auf den Radioeisenumsatz bei Ganzkörperbestrahlungen unter 100 R.
Strahlentherapie 124: 99-107, 1964

- Koch R, Seiter I: Untersuchungen über einen biologischen Strahlenschutz. 61. Mitteilung: Geschlechtsunterschiede der Strahlenempfindlichkeit der Maus im Dosisbereich unter 100 R (Untersuchungen mit Radioeisen).
Strahlentherapie 126: 309-316, 1965
- Koch R, Seiter I: Untersuchungen über einen biologischen Strahlenschutz. 69. Mitteilung: Einfluß einer Kopfbestrahlung auf den Radioeiseneinbau in Erythrozyten.
Strahlentherapie 129: 698-615, 1966
- Kövecses M, Unger E: Histological effects of low-dose-rate gamma-irradiation
Strahlentherapie 158, Nr. 1, 50-54, 1982
- Kunkel HA, Mauss HJ, Mihm K: Strahlenbiologische Untersuchungen mit chrommarkierten Erythrozyten IV. Besteht ein Zusammenhang zwischen Erythrozytenlebensdauer und Strahlenempfindlichkeit?
Strahlentherapie 131:137-142, 1966
- Langendorff H, und Koch R: Untersuchungen über einen biologischen Strahlenschutz. 6. Mitteilung: Über die Absterbeordnung röntgenbestrahlter Mäuse, die Unterschiede des Geschlechts und den Einfluß der Keimdrüsen auf die Strahlenempfindlichkeit.
Strahlentherapie 94: 250-257, 1954
- Langendorff H: Zur Induktion von Spätschäden bei chronischer äußerer Einwirkung kleiner Strahlendosen. Strahlentherapie 122, 1 - 15, 1963
- Langlois RG, Bigbee WL, Kyoizumi S, Nakamura N, Bean MA, Akiyamam M and Jansen RH: Evidence For an increased frequency of somatic cell mutations at the glycophorin A locus in A – bomb survivors.
Science, Vol. 236, 1987
- Lorenz E Recovery patterns of the blood picture in guinea pigs following a limited total – body exposure
J. Chim. Phys. 48: 264, 1951
- Messerschmidt O: Über den heutigen Stand der Diagnostik und Therapie von Strahlenschäden als Folge Nuklearer Unfälle und Katastrophen (Unter Berücksichtigung der beim Tschernobyl-Unfall gewonnenen Erfahrungen. München, 1987
- Messerschmidt O, Chaudhuri JP, Sedelmeir H: Untersuchungen zur Verbesserung des Strahlenschadenfrüherkennungsgerätes sowie zur Wirkung von neu entwickelten Strahlenschutzsubstanzen. Abschlußbericht im Auftrag des Bundesamtes für Wehrtechnik und Beschaffung, Mai 1980
- Nelson RF: Variation in radiosensitivity of mice with time of day.
Acta Radio. 4: 91-96, 1966
- Neumeister K, Barth I, Baumann H, Gold F, Niemiec C, Schwendt P, Stölter B, Jung K, Stitte A, Reissbeck KH, Hegewald H: Pathobiochemische, hämatologische und immunologische Befunde bei klinisch symptomarmen Verlauf der akuten Strahlenkrankheit des Schweines
1. Mitteilungen: Pathobiochemische Befunde. Radiobiol. Radiother. 19, 740-748, 1978
- Paprocka – Slonka E, Kuratowska Z: The effect of sublethal (500 R) dose of X – ray on erythropoiesis in rats. Acta Haematol. Pol. 4: 239-245, 1973
- Paprocka – Slonka E, Kuratowska Z: The effect stimulators on erythropoietic regeneration in rats irradiated with sublethal doses of X-rays.
Acta Haematol. Pol. 4: 247-253, 1973

- Pauly H: Biologische Strahlenwirkungen: Physikalische, chemische und biologische Grundlagen; somatische und Genetische Schäden, in: Bernhard J, Hase G, Pauly H, Pfister H, Säbel M, Schmidt Th, Schüßler H: Kursus der Radiologie einschließlich Strahlenschutzkursus, 3. Auflage, Erlangen, Verlag Ludwig Müller 1975
- Peters R, Sailer U, Peters K: Zur Variabilität des Dosiseffects im strahlenbiologischen Tierversuch: 1. Mitteilung: Einfluß von Rasse, Geschlecht und Alter auf Absterberaten und LD_{50,30}-Werte. Strahlentherapie 157: 50-62, 1981
- Peters R, Sailer U, Peters K: Zur Variabilität des Dosiseffects im strahlenbiologischen Tierversuch: 2. Mitteilung: Einfluß von Rasse, Geschlecht, Alter sowie Infektionen auf die Absterberaten und die LD_{50,30}-Werte. Strahlentherapie 157: 114-123, 1981
- Peters R, Sailer U, Peters K: Zur Variabilität des Dosiseffects im strahlenbiologischen Tierversuch: 3. Mitteilung: Einfluß von Rasse, Geschlecht, Alter sowie Strahlendosis auf den Gewichtsverlauf und die Überlebenszeit in Tagen nach Ganzkörperbestrahlung bei Wistar- und Siv-50-Ratten. Strahlentherapie 157: 124-133, 1981
- Peters K, Sailer U, Peters R: Zur Variabilität des Dosiseffects im strahlenbiologischen Tierversuch: 4. Mitteilung: Der Einfluß der Tiergruppengröße (Käfigeffekt) im strahlenbiologischen Tierversuch. Strahlentherapie 157: 191-207, 1981
- Rappoport DA, Sewell BW: Metabolic changes induced in mammalian erythrocytes by whole-body X-Irradiation. Nature 184: 846-849, 1959
- Reddy MR Fuhr JE: The effect of ionizing radiation in vitro upon fetal mouse liver erythroid cells. Radiat. Res. 88: 79-85, 1981
- Reincke U, Goedmann E, Meilmann H, Jesdinky H-J: Zur altersabhängigen Strahlenempfindlichkeit weißer Ratten. 3. Mitteilung: Bestimmung der LD_{50,30} während der Säuglingszeit und Wachstumsalter. Strahlentherapie 136: 349-359, 1968
- Reincke U, Rother M, Andris R: Zur altersabhängigen Strahlenempfindlichkeit weißer Ratten. II. Bestimmung der LD_{50,30} im späten Fötalalter und kurz nach der Geburt. Strahlentherapie 136: 93-99, 1968
- Rensing L: Tagesperiodik von Zellfunktionen und Strahlenempfindlichkeit in Normal- und Tumorgewebe. Natur Rdsch. 22: 390-396, 1969
- Richmond JE, Altman KI, Salomon K: The effect of X-radiation on the biosynthesis of hemoglobin. J. Biol. Chem. 190: 817-825, 1951
- Robev S, Dessev G: Radiation effect on protein synthesis and RNA metabolism in reticulocytes in vitro. Doklady Bolgarsy Akademii Nauk 17: 57-60, 1964
- Roy RM, Malick MA, Clark GM: Increased haematopoietic stem cell survival in mice injected with tocopherol after X-irradiation. Strahlentherapie 158, Nr. 5, 312-318, 1982
- Rose H, Arndt A, Wolf G, Neumeister K, Riessbeck KH, Gold F, Barth J, Baumann H, Niemiec C, Stölter B, Schwendt P: Pathobiochemische, hämatologische und immunologische Befunde bei klinisch symptomarmen Verlauf der akuten Strahlenkrankheit des Schweines. 3. Mitteilungen: Immunologische Befunde. Radiobiol. Radiother. 19, 754-760, 1978

- Rugh R Clugston H: Radiosensitivity with respect to the estrous cycle in the mouse. *Radiat. Res.* 2:227-236, 1955
- Schneider R: Vergleichende Untersuchungen über die Wirksamkeit einiger Zytostatika und der Röntgenbestrahlung. *Strahlentherapie* 124, 75-85, 1964
- Stobbe H, Neumeister K, Stölter B, Baumann H, Beutell M, Gold F, Niemiec C, Schwendt P, Grunze S: Pathobiochemische, hämatologische und immunologische Befunde bei klinisch symptomarmem Verlauf der akuten Strahlenkrankheit des Schweines. 2. Mitteilungen: Hämatologische Befunde. *Radiobiol. Radiother.* 19, 749-753, 1978
- Stohlman F: Humoral regulation of erythropoiesis VI. Mechanism of action of erythropoietin in the irradiated animal. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107: 751, 1961
- Szemere P, Fliedner TM, Nothdurft W, Breitig D: Excorporeal Irradiation of dog blood: The effects of a radiostrontium irradiator on blood stem cells (CFU-C) *Strahlentherapie* 158, Nr. 7, 444-449, 1982
- Takada A, Takada Y, Kim U, Ambrus J L: Bone marrow, spleen und thymus regeneration patterns in mice after whole – body Irradiation. *Radiat. Res.* 45: 5522-535, 1971
- Trávníček T, Neuwirt J, Taborsky J, Stoklasová H: Die Wirkung verschiedener Strahlendosen auf die Erythropoese von Ratten. *Strahlentherapie* 130: 376-390, 1966
- Wolf G, Gensicke F: Das Verhalten von Retikulozyten des peripheren Blutes nach Ganzkörperbestrahlung und Stimulation des Knochenmarks – ein Beitrag zum Nachweis strahlenbedingter Veränderungen an Zellen des peripheren Blutes. *Folia Haematol.* 108: 462-471, 1981

3. Automatische Zählung von Retikulozyten

- England JM, Bain BJ, Chetty MC, Broom G, Dean A: An assessment of Coulter Counter models S Plus II and III. *Clin. ab. Haemat.* 5, 399-412, 1983
- England JM, Rowan RM, van Assendelft OW, Coulter WH, Groner W, Jones AR, Koepke JA, Lewis SM, Shinton NK, Thom R: Protocol for evaluation automated blood cell counters. *Clin. ab Haemat.* 6, 69-84, 1984
- Horiuchi H, Yokonichi H, Suzuki R, Hashizume A, Yamamoto S, Yoshida K, Masushita H: Automated reticulocyte counting. *Iodenshi To Setai Kogaku* 19: 9-16, 1981
- Thaer A, Becker H: Microscope fluorometric investigations on the reticulocyte maturation distribution as diagnostic criteria of disordered erythropoiesis. *Blut* 30: 339-348, 1975
- Thaer AA: Microfluorometric analysis of the reticulocyte population in peripheral blood of mammals. In: Evans DMD: *Cytology Automation*, p. 190-196, Livingstone Ltd. Edinburgh, London 1970

4. Eisenaufnahme in Retikulozyten

- Gerber GB, Maes J: Iron incorporation after single and fractionated irradiation of infant mice. *Acta Radiol. Oncol.* 19: 483-488, 1980
- Hodgson GS: Erythrocyte ⁵⁹Fe uptake as a function of bone marrow dose injected in lethally irradiated mice. *Blood* 19, No. 4: 460-467, 1962

- Kankura T, Nakamura W, Eto H, Nakao M: Effect of ionizing radiation on passive transport of sodium ion into human erythrocytes.
Int. J. Radiat. Biol. 15:125-136, 1969
- Kolousek J, Gyoergui S: ^{59}Fe incorporation into rat erythrocytes after a Single dose of L-methionine sulphoximine and afer 600 R X-ray Irradiation.
Neoplasma 13: 280-293, 1966
- Lohmann W, Glasgow JL Perkins WH: Iron 59 incorporation into erythrocytes of hamsters after Irradiation. Am. J. Physiol 201: 1134-1136, 1961
- Maillie HD, Mermagen H: The relationship between intramedullary dose and ^{59}Fe uptake in the bones of rats exposed to whole – body 250 kVp X-irradiation.
Health Phys. 20: 179-185, 1971
- Maillie HD, Baxter RC, Lisman H: The use of ^{59}Fe uptake in estimating the marrow dose in normal and splenectomized rats exposed to 1000 kVp X-irradiation.
Health Phys. 33: 425-429, 1977
- Malams B, Gyftaki E Proukakis Ch: The iron uptake by retikulocytes in normal subjects, in subjects with thalassaemia minor and in patients with thalassaemia major.
Acta Haematol. 29: 80-88, 1963
- Myhre E: Iron uptake by human erythroid cells in vitro.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 16: 201-211, 1964
- Papayannopoulou T, Finch CA: Radioiron measurements of cell maturation
Blood cells 1, 535-546, Springer-Verlag, 1975
- Suit HD, Lajtha LG, Oliver R, Ellis F: Studies on the ^{59}Fe uptake by normoblasts and the failure of X-irradiation to affect uptake.
Brit. J. Haemat. 3: 165-174, 1957

Die Autoren

Egner, Hans Joachim

Dr. rer. nat.

Institut für Biophysik der Universität Frankfurt am Main
Paul-Ehrlich-Straße 20, 60596 Frankfurt/Main

Pohlit, Wolfgang

Professor, Dr. rer. nat.

Institut für Biophysik der Universität Frankfurt am Main
Paul-Ehrlich-Straße 20, 60596 Frankfurt/Main

Werner, Eckhardt

Dr. rer. nat.

Institut für Biophysik der Universität Frankfurt am Main
Paul-Ehrlich-Straße 20, 60596 Frankfurt/Main

Strahlenbedingte Änderung der Chemilumineszenz von Granulozyten als biologischer Dosisindikator

Hans Mönig, Gerhard Konermann

Einführung

Für die Untersuchungen wurde eine Methode verwendet, bei der die Phagozytoseaktivität von Granulozyten stimuliert wird. Durch Einbringen eines Fremdkörpers (z.B. Zymosan, ein Hefe-Polysaccharid) in eine Blutlösung kommt es zu einem Kontakt mit dem Phagozyten. Dadurch wird eine membrangebundene NADPH-Oxidase aktiviert, die molekularen Sauerstoff durch einen Ein-Elektronenübertragungsschritt zu Superoxid (O_2^-) reduziert (Allen et al., 1972). Superoxid kann in Folgereaktionen zu Singulett-Sauerstoff, Hydroxylradikalen und Wasserstoffperoxid disproportionieren. Diese Reaktionen finden sowohl an der Plasmamembran als auch im Phagozylisom statt (Abb. III.1). Mit dem zyklischen Hydrazid Luminol reagieren diese

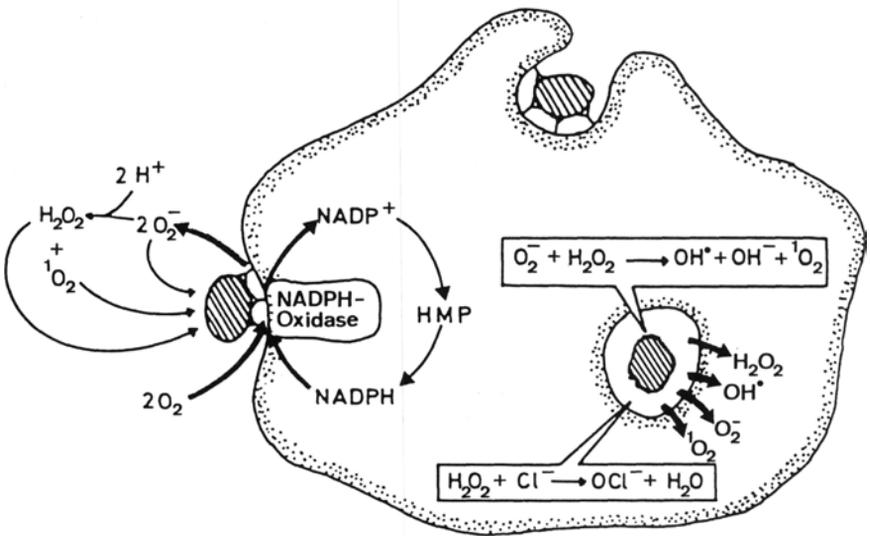


Abb. III.1 Schema der bei der Phagozytose gebildeten Sauerstoffmetabolite (Fischer et al., 1982).

Sauerstoffmetabolite und führen zu Chemilumineszenz-Erscheinungen. Die Chemilumineszenz (CL) kann in vitro im verdünnten Vollblut gemessen werden (Fischer und Staudinger, 1981). An Blutproben des Menschen konnte gezeigt werden, daß die Granulozyten den Hauptteil bei der durch Zymosan stimulierten CL beitragen (Kato et al., 1981). Die im Vollblut anwesenden Erythrozyten vermindern zwar die Lichtausbeute der CL durch Absorption beträchtlich, brauchen jedoch nicht berücksichtigt zu werden, solange ihre Zahl und der Hämatokritwert nicht allzustark nach oben oder unten abweichen (Fischer et al., 1982). Tierexperimentelle Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, daß die CL einer Blutprobe durch vorherige Bestrahlung des Tieres verändert wird (Fischer et al., 1982; Hovestadt et al., 1983). Das Ziel des Forschungsvorhabens bestand darin zu prüfen, ob eine dosisabhängige Veränderung der CL besteht und ob sich somit das Verfahren für eine Biologische Dosimetrie eignet.

Material und Methoden

Tiere

Für die Versuche wurden zum Zeitpunkt der Bestrahlung zehn bis elf Wochen alte männliche Mäuse eines institutseigenen Auszuchtstamms verwendet, der in der Literatur als Heiligenberg-Stamm bezeichnet wird. Das Gewicht der Mäuse lag im Mittel bei 31 g. Ernährt wurden die Tiere mit einer Standarddiät Altromin der Altromin GmbH, Lage/Lippe. Mit HCl angesäuertes Trinkwasser stand den Mäusen ad libitum zur Verfügung.

In Abb. III.2 ist schematisch dargestellt, wie die Präparation zur Chemilumineszenzmessung durchgeführt wurde. Den Tieren wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen. Um tageszeitliche Schwankungen in den Blutwerten zu vermeiden (Smith et al., 1965), erfolgte die Blutentnahme immer zur gleichen Zeit um 9.00 Uhr. Neben den CL-Messungen wurden Leukozytenzählungen in 0,5 %iger Essigsäure mit einer Neubauer-Kammer durchgeführt und Differentialblutbilder (May-Grünwald-Lösung und Giemsa-Lösung) ausgewertet. In Abb. III.3 ist die Häufigkeitsverteilung für die Granulozytenzahl bei unbehandelten und unbestrahlten Kontrolltieren dargestellt.

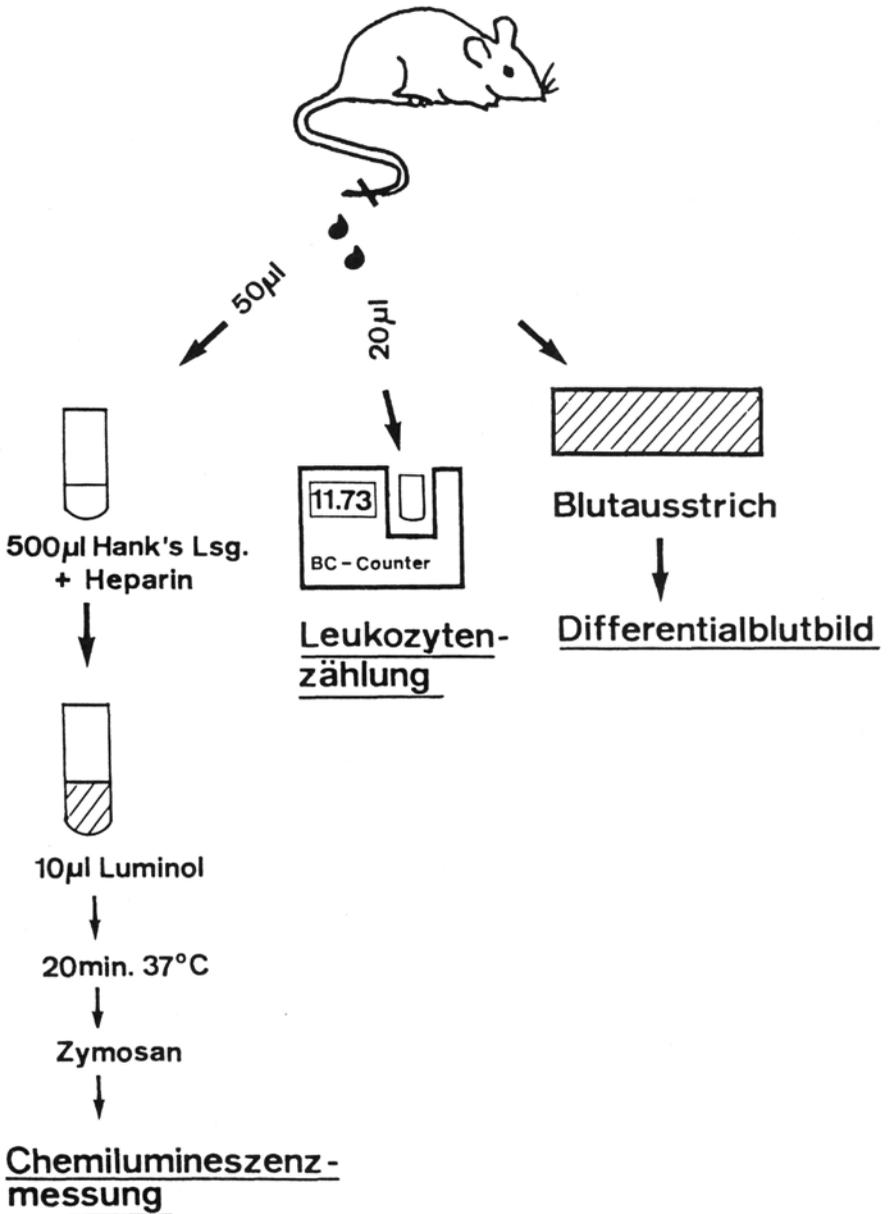


Abb. III.2 Schematische Darstellung der Blutuntersuchungen an bestrahlten und nicht bestrahlten Mäusen.

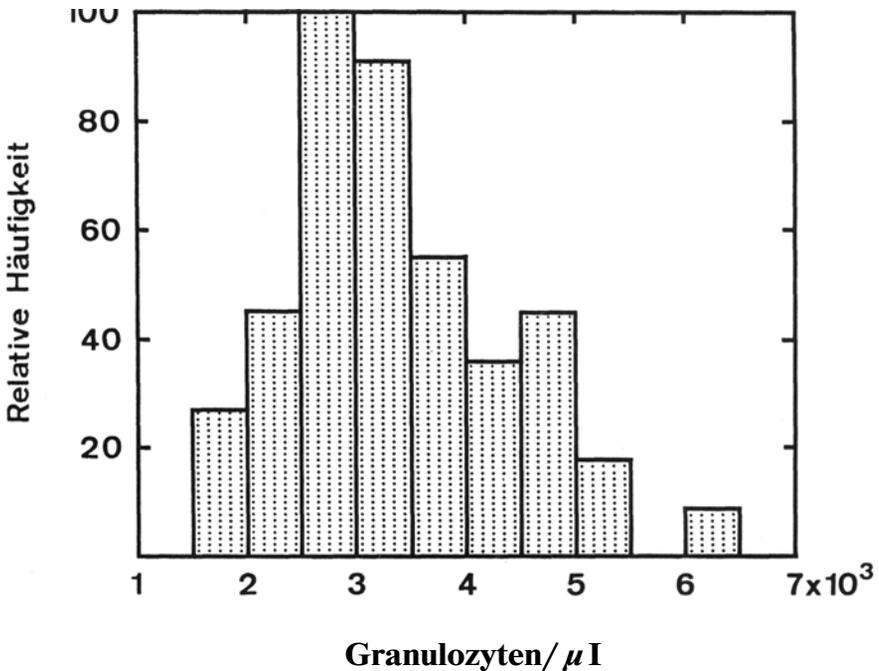


Abb. III.3 Häufigkeitsverteilung der Granulozytenzahl für 47 unbehandelte und im bestrahlte Mäuse. Der Mittelwert beträgt 3409 Granulozyten pro μl mit einer Standardabweichung von ± 1040 Granulozyten pro μl .

Chemikalien und Reagenzien

May-Grünwald-Lösung: Eosin-Methylenblau-Lösung von Merck, Darmstadt.

Giemsa-Lösung: Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung von Merck, Darmstadt.

Hanks' Salz-Medium wurde in folgender Zusammensetzung ohne Phenolrot angesetzt: NaCl (8000), KCl (400), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60), KH_2PO_4 (60), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (100), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100), CaCl_2 (140), Glucose (1000). Alle Zahlenangaben im mg/l. Das Medium erhielt eine Sterilfiltration.

Heparin: Als Antikoagulant wurde dem Hanks' Medium Na-Heparin zugesetzt. Verwendet wurde Liquemin® 25000 von der Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen (1 ml enthält 5000 I.E. Heparin-Natrium). 1 ml Hanks' Medium wurden $0,2\mu\text{l}$ Liquemin® (1 I.E. Heparin) zugesetzt.

Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion) wurde als kristalline Substanz von der Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, bezogen. Luminol löst sich im alkalischen Milieu. 2 mg Luminol wurden in 1 ml Glycin/NaOH-Puffer pH 10,6 nach Sörensen gelöst. Der pH-Wert der Luminol-Lösung betrug 10,0.

Lucigenin (10,10-Dimethyl-9,9'-biacridinium-dinitrat) wurde als kristalline Substanz von der Sigma Chemical Comp., St. Louis, Mo, USA, bezogen. 4 mg Lucigenin wurden in 1 ml Glycin/NaOH-Puffer pH 10,6 nach Sörensen gelöst. Der pH-Wert der Lucigenin-Lösung betrug 10,4.

Zymosan, ein Hefezellwand-Polysaccharid (Nr. Z-4250) der Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, wurde im Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg i. Br., durch Beladung mit Blutserum vom Meerschweinchen präpariert (opsoniertes Zymosan). Die Konzentration der Zymosan-Suspension in phosphatgepufferter Kochsalzlösung PBS betrug 12,5 mg/ml. Für die Überlassung des Präparats haben wir P. G. Munder und M. Modolell vom MPI für Immunbiologie, Freiburg i. Br., herzlich zu danken. Zum Starten der Reaktion wurden dem Blut 10 μ l Zymosan-PBS-Suspension zugesetzt. Vergleichbare Ergebnisse erhält man auch mit nicht-opsoniertem Zymosan. Das in PBS suspendierte Zymosan muß in diesem Fall mit Ultraschall behandelt werden.

150 mg *Cystaminiumchlorid* zur Synthese der Firma Merck-Schuchardt, München, wurden in 10 ml aqua bidest. gelöst.

Chlortetracyclinhydrochlorid (Reinsubstanz) von der Cynamid GmbH (Lederle Veterinärprodukte), Wolfratshausen, wurde bei der Aufzucht und bei bakteriell bedingten Infektionskrankheiten dem Trinkwasser mit 0,3 g pro l zugesetzt.

Bestrahlung

Die Bestrahlung erfolgte mit einem Röntgengerät Stabilipan 2 der Siemens AG, Erlangen. Bei einer Röhrenspannung von 250 kV, einer Stromstärke von 15 mA, einer HWD von 2 mm Cu und einem Fokus-Kammer-Abstand von 75 cm betrug die Dosisleistung 0,6 Gy/min. Für Bestrahlungen mit der geringeren Dosisleistung von 0,02 Gy/min wurden am Stabilipan 240 kV (HWD: 1,9 mm Cu) bei einer Stromstärke von 2 mA und einem Fokus-Kammer-Abstand von 140 cm eingestellt. Die Dosis und die Dosisleistung wurden mit dem Meßgerät Dosimentor DL 4 und DI 4 der Physikalisch-Technischen Werkstätten Dr. Pychlauer, Freiburg i. Br., kontrolliert. Die Ionisationskammer des Dosimeters befand sich während der Bestrahlung der Versuchstiere im Zentrum eines runden Plexiglasgefäßes. Bis zu sechs Tiere konnten gleichzeitig

bestrahlt werden (Ganzkörperbestrahlung). Der Käfig war von einem Plexiglasring umgeben, um maximale Streubedingungen auch für die Tiere am Käfigrand zu erreichen. Durch Verwendung von Phantomen in der Größe von Mäusen, die mit einer FrickeLösung (Fricke und Hart, 1966) gefüllt waren, konnte nachgewiesen werden, daß 100 R Ionen-dosis einer Energiedosis von 0,95 Gy entsprachen. Es wurden Strahlen-dosen im Bereich von 1 bis 8 Gy verwendet.

In einer anderen Versuchsserie erhielten Mäuse eine Teilkörperbestrahlung mit 250 kV-Röntgenstrahlen, wobei Dosisleistungen von 0,6 Gy/min verwendet wurden. Bei der Teilkörperbestrahlung war die untere Körperhälfte (etwa 50 % des ganzen Körpers) mit 8 mm Blei abgedeckt (Abb. III.4). Messungen an Phantomen mit Hilfe der Fricke-Dosimetrie

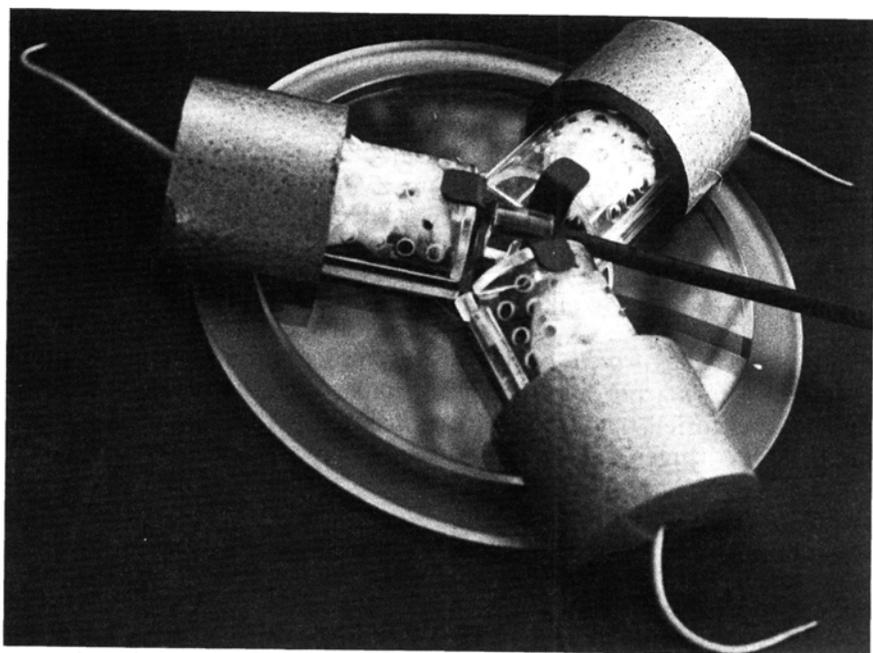


Abb. III.4 Anordnung für eine Teilkörperbestrahlung von drei Mäusen, deren untere Körperhälfte mit 8 mm Blei abgedeckt ist.

ergaben, daß die abgedeckte Körperhälfte mit etwa 10 % der Dosis der oberen Körperhälfte durch Streustrahlung belastet war. Die Bleikante der Abdeckung lag etwa in Höhe des Sternums der Tiere. Anhand von Messungen mit Radioeisen konnten Briganti et al. (1970) zu einer prozentualen Verteilung des Knochenmarks im Skelett der Maus kommen. Der Anteil des Knochenmarks im Schädel wurde bei diesen Versuchen

nicht ermittelt. Aus hämatologischen Untersuchungen nach Kopfbestrahlungen an der Maus scheint jedoch hervorzugehen, daß der Anteil des Knochenmarks im Schädel gering ist (Koch und Seiter, 1966). Aufgrund dieser Knochenmarkverteilung ließ sich ermitteln, daß in unserer Bestrahlungsanordnung, unter Einbeziehung der 10 % Streustrahlenanteil für die abgedeckte Körperhälfte, etwa die Hälfte des Knochenmarks bestrahlt wird. Jeder Gruppe bei den Teilkörperbestrahlungen wurde eine scheinbestrahlte Kontrollgruppe zugeordnet.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluß der Strahlenschutzsubstanz Cystamin auf die CL getestet. Den Tieren wurden 10 bis 15 min vor der Bestrahlung 150 mg Cystaminiumchlorid pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Tiere mit einem Gewicht von 30 g erhielten 0,3 ml der Cystaminlösung. Kontrolltieren wurde eine entsprechende Menge physiol. NaCl-Lösung injiziert.

Für Bestrahlungen von Mäuseblut *in vitro* wurde eine ^{60}Co -Gamma-Strahlenquelle „Gammacell 220“ der Atomic Energy of Canada Ltd. verwendet. Die Dosisleistung betrug 50 Gy/min.

Messung der Chemilumineszenz im verdünnten Vollblut

Die Blutproben wurden in Lumacuvetten (Cat. No. 9200) aus Kunststoff der Fa. Lumac, Holland, gefüllt. Die CL-Messungen erfolgten mit einem 6-Kanal-Biolumat-Meßgerät LB 9505 des Laboratoriums Prof. Dr. Berthold, Wildbad (Berthold et al., 1981). Mit diesem Gerät konnten gleichzeitig Blutproben von je drei unbestrahlten und bestrahlten Tieren gemessen werden. Abb. III.5 zeigt einen Ausdruck für solch eine Messung. Die ausgedruckten Meßwerte sind noch mit dem Faktor 1000 zu multiplizieren. Verwendet wurde jeweils die Gesamtintensität (Fläche unter der Kurve) für die Zeitspanne 20 min (Zeitpunkt des Zymosan-Zusatzes) bis zu 60 Min. In Abb. III.6 ist die Häufigkeitsverteilung der CL-Ausbeuten für 230 unbestrahlte Tiere dargestellt, die als Kontrollen für die Untersuchungen über die Wirkung von Ganzkörperbestrahlungen dienten.

Anstelle der Gesamtintensität hätte auch die Maximalintensität (Peak) verwendet werden können. Die Maximalintensität wird jeweils mit ausgedruckt. In Abb. III.7 ist der Zusammenhang zwischen der Gesamt- und der Maximal-Intensität für unbestrahlte und bestrahlte Tiere dargestellt. Eine Korrelations-Analyse zwischen beiden Parameters hat den dicht bei 1 liegenden Korrelationskoeffizienten von 0,9871 für nichtbestrahlte Tiere und 0,9912 für ganzkörperbestrahlte Tiere ergeben. Die Zeit zum Erreichen der Maximalintensität ist abhängig von der Gesamtintensität (Maximalintensität), wobei sich der Zeitpunkt mit wachsen-

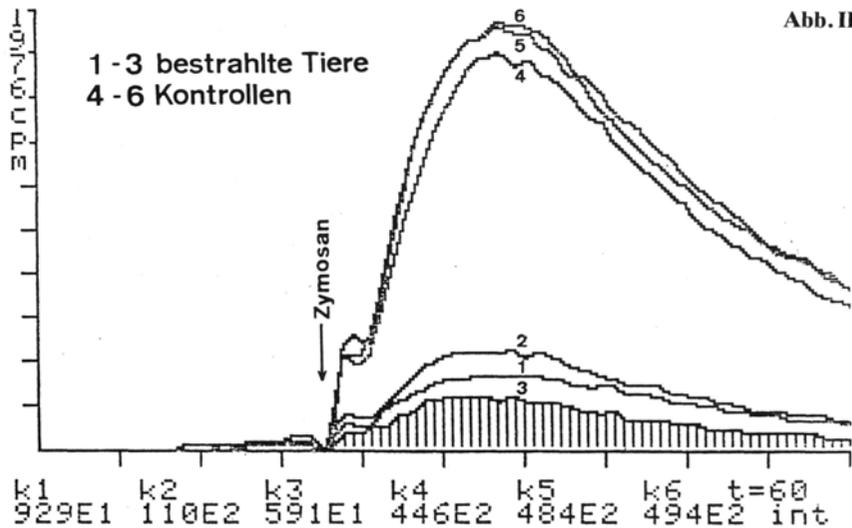


Abb. III.5

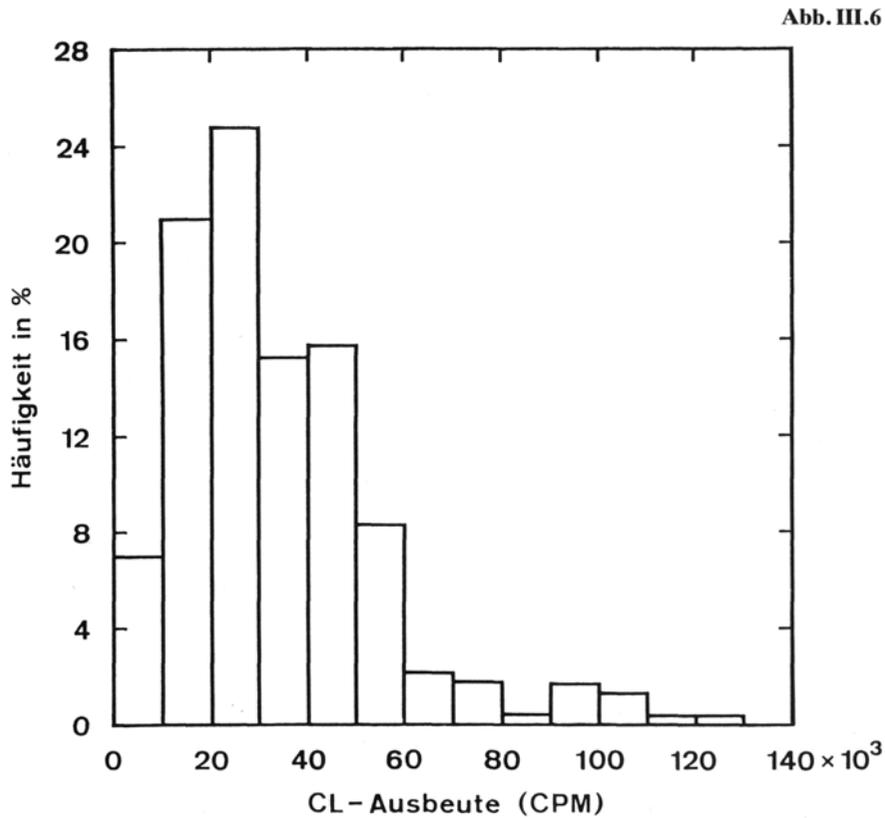


Abb. III.6

Abb. III.5 Ausdruck des zeitlichen Verlaufs der CL-Lichtausbeute von Blutproben unbestrahlter (Kontrollen) und bestrahlter Mäuse. Die Blutentnahme erfolgte 4 Tage nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 2 Gray. Die Zeitskala erstreckt sich über 60 min (1 Teilstrich= 6 min). Die Zugabe opsonierten Zymosans für die Phagozytose-Stimulierung erfolgte 20 min nach Temperierung der Blutproben auf 37° C. Die Zahlen für die Kanäle k1 bis k6 geben die Summenwerte der Lichtausbeute wieder. (s. Seite 146)

Abb. III.6 Häufigkeitsverteilung der Chemilumineszenz (CL)-Ausbeute für 230 unbestrahlte Tiere. Der Mittelwert der CL-Ausbeute beträgt für dieses Kollektiv 33788 cpm mit einer Standardabweichung von ± 21268 cpm. (s. Seite 146)

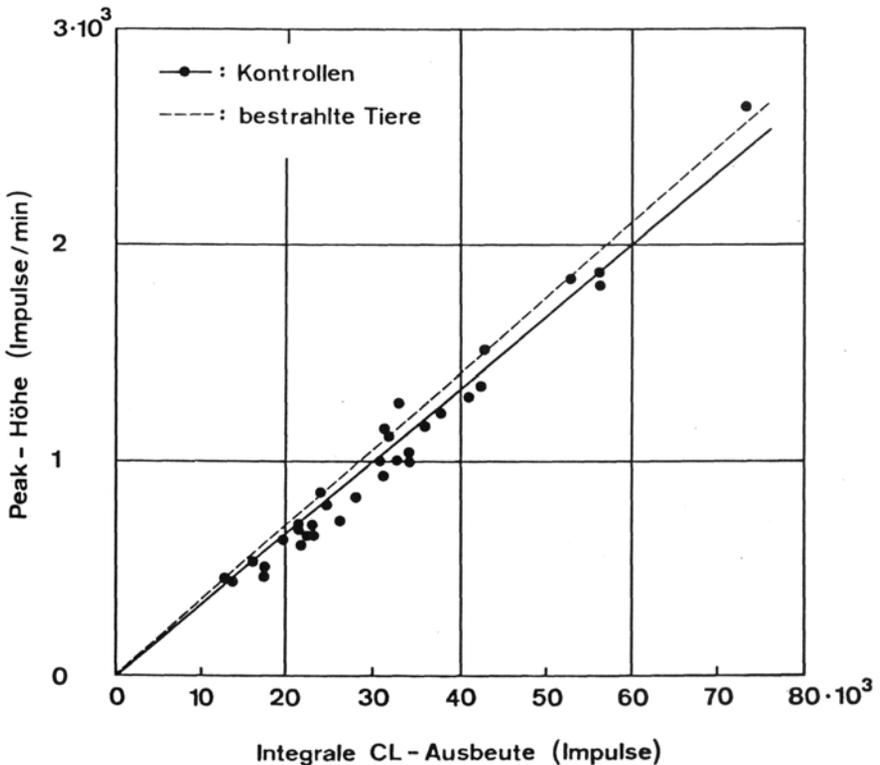


Abb. III.7 Abhängigkeit der Peak-Höhe der Chemilumineszenz (CL) von der integralen CL-Ausbeute bei unbestrahlten Mäusen. In die Abbildung wurde der Verlauf für ganzkörperbestrahlte Tiere (1 bis 8 Gy) ohne Wertepaare eingezeichnet. Die Geraden wurden mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt.

der Gesamtintensität vermindert. Dieses Verhalten kommt in negativen Korrelationskoeffizienten mit $-0,5498$ für unbestrahlte und $-0,5118$ für ganzkörperbestrahlte Tiere zum Ausdruck. Beide Korrelationskoeffizienten weichen statistisch signifikant mit $P < 0,001$ bzw. $0,01$ von dem Wert Null ab. Beim Vorliegen des Wertes Null würde keine Korrelation bestehen.

In der vorliegenden Arbeit wird sehr allgemein der Begriff Chemilumineszenz-Ausbeute verwendet. Darunter wird entweder die gemessene Intensität in Lichtimpulsen pro Minute (cpm) oder die zeitlich integrale Intensität in Lichtimpulsen verstanden. Da die CL-Ausbeute von der Granulozyten-Konzentration abhängig ist, wurde die CL auf gleiche Granulozytenzahlen (CL pro 1000 Granulozyten) umgerechnet. Dieser Wert wird „normierte Chemilumineszenz“ genannt (Fischer et al., 1982) und stellt ein Maß für die mittlere Leistungsfähigkeit der Granulozyten hinsichtlich der Sauerstoffmetaboliten dar.

Die Untersuchungen wurden im Zeitraum von 1982 bis 1987 durchgeführt.

Ergebnisse

Einfluß verschiedener Parameter auf die Chemilumineszenz-Ausbeute

Luminol und Lucigenin

Allen berichtet 1982, daß für den Nachweis der während der Phagozytoseaktivität entstehenden Sauerstoffmetabolite neben dem Luminol auch Lucigenin verwendet werden kann. Die Lichtausbeuten beider Substanzen sollen vergleichbar sein. Allerdings sind die Ausbeuten von der Art der Stimulation der Granulozyten abhängig. In einem Vorversuch wurde getestet, welche der chemiluminigenen Sonden für unsere Untersuchungen besser geeignet ist. In Tabelle III. 1 ist das Ergebnis des

Tabelle III.1. Vergleich der Chemilumineszenz (CL)-Ausbeute von Luminol und Lucigenin bei Verwendung von Blutproben der gleichen unbestrahlten Mäuse.

Substanz	Granulozyten/ μl	CL-Ausbeute (Imp./min)
Luminol	$1986 \pm 254^*$	$16\,736 \pm 3\,168^*$
Lucigenin	$1986 \pm 254^*$	$6\,248 \pm 1\,200^*$

*: S. E. M. = $SD/n^{0,5}$ (n = 9 Tiere)

Vergleichs zusammengestellt. Wie zu erkennen ist, ist die Lichtausbeute bei Verwendung von Luminol in unserer Versuchsanordnung mit dem Stimulans Zymosan größer. Deswegen wurden die weiteren Versuche nur mit der Substanz Luminol durchgeführt.

Einfluß der Blutmenge

In Abb. III.8 ist der Einfluß der Blutmenge auf die CL-Ausbeute für den Volumenbereich 5 bis 100 μl dargestellt. Wie zu erkennen ist, ergibt sich

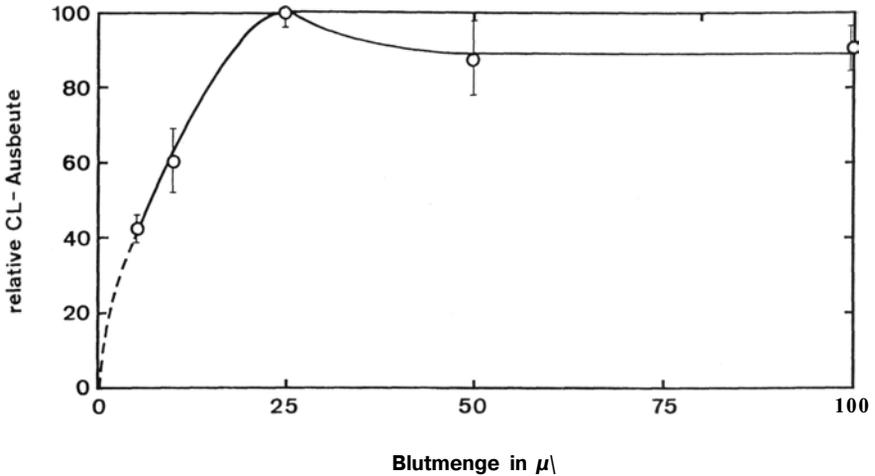


Abb. III.8 Abhängigkeit der Chemilumineszenz-Ausbeute von der Blutmenge. Mit entsprechenden Volumina Hank's-Lösung wurde bei allen Proben die gleiche Füllhöhe in den Lumacuvetten eingestellt. Unterschiedliche Füllhöhen beeinflussen ebenfalls die CL-Ausbeute. Die übrigen zugefügten Reagenzien entsprachen den Angaben der Abb. III.2. Es sind jeweils die Mittelwerte von drei Tieren und die Standardfehlern (S. E. M.) eingetragen.

zunächst bis zu 25 μl Blut ein steiler Anstieg in der CL-Ausbeute. Oberhalb von 25 μl ist mit größeren Blutmengen keine Steigerung der Chemilumineszenz zu erreichen. Dieses Sättigungsverhalten dürfte einmal darauf zurückzuführen sein, daß die Zymosanmenge nicht mehr ausreicht, um alle Granulozyten genügend zu stimulieren. Dies geht auch aus dem Verlauf der CL-Ausbeute mit der Zymosanmenge (s. Abb. III. 10) hervor. Zum anderen befinden sich mit zunehmender Blutmenge auch immer mehr Erythrozyten im Reaktionsgefäß. Die Erythrozyten absorbieren das durch Sauerstoffmetabolite über Luminol erzeugte Licht. Beide Effekte, höhere Lichtausbeute durch mehr Sauerstoffmetabolite und verstärkte Absorption durch erhöhte Anzahl von Erythrozyten, kompensieren sich bei größeren Blutmengen.

In unseren Versuchen wurden 50μ Blut verwendet. Mit dieser Blutmenge ist man im Sättigungsbereich. Geringe Abweichungen in der zugefügten Blutmenge sollten sich in der CL-Ausbeute kaum auswirken.

Einfluß der Luminolkonzentration

In Abb. III.9 ist die CL-Ausbeute in Abhängigkeit von der Luminolmenge im Bereich zwischen 2 und 10μ l aufgetragen. Die Lichtausbeute steigt mit zunehmender Luminolmenge an, wobei die Steigerungsrate mit wachsender Konzentration abnimmt. Dieses Verhalten erklärt sich durch die konstante Menge an Sauerstoffmetaboliten. Offensichtlich sind jedoch bei 10μ Luminol noch nicht alle Sauerstoffmetabolite erfaßt. Der aus dem Trend fallende Meßpunkt bei 4μ Luminol ist nicht zu erklären.

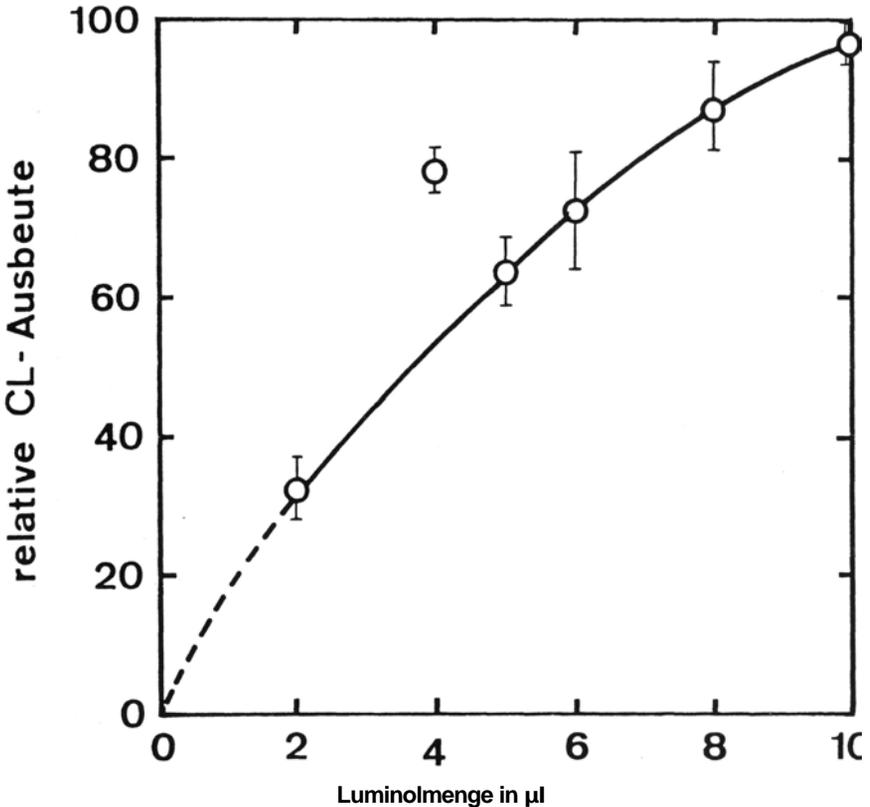


Abb. III.9 Abhängigkeit der Chemilumineszenz-Ausbeute von der Luminolmenge mit jeweils 25μ l Blut. Die übrigen zugefügten Reagenzien entsprachen den Angaben der Abb. III. 2. Es sind jeweils die Mittelwerte aus Versuchen mit drei Tieren und die Standardfehler (S.E.M.) eingetragen.

Einfluß der Zymosankonzentration

In Abb. III. 10 ist die CL-Ausbeute in Abhängigkeit von der Zymosanmenge im Bereich von 1 bis 40 μl aufgetragen. Der Kurvenverlauf zeigt ein deutliches Sättigungsverhalten. Im Bereich um 50 μl Zymosanmenge ist offensichtlich das Maximum der Stimulation erreicht. Die in den vorliegenden Versuchen verwendeten 10 μl führen jedoch zu einer ausreichenden Stimulation.

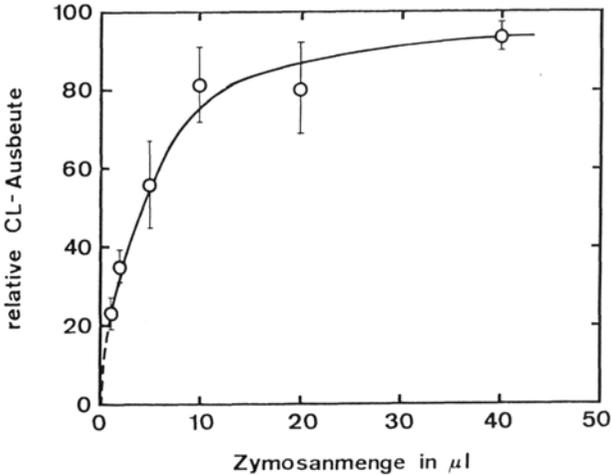


Abb. III.10 Abhängigkeit der Chemilumineszenz-Ausbeute von der Zymosanmenge mit jeweils 25 μl Blut. Die übrigen zugefügten Reagenzien entsprachen den Angaben der Abb. III.2. Es sind jeweils die Mittelwerte aus Versuchen mit drei Tieren und die Standardfehler (S.E.M.) eingetragen.

Einfluß eines Breitbandantibiotikums

Um im frühen postnatalen Alter der Aufzuchttiere Infektionen zu vermeiden, erhielten die Muttertiere bis zu drei Wochen nach der Geburt das Breitbandantibiotikum Chlortetracyclinhydrochlorid (Aureomycin) mit dem Trinkwasser ad libitum. Auch bei nachgewiesenen Infektionen im Darmbereich wurde das Antibiotikum mit dem Trinkwasser gegeben. Von einigen Antibiotika ist bekannt, daß sie Knochenmarks-Depressionen verursachen (Eastham, 1968). Es wurde geprüft, wie sich das Chlortetracyclin auf das Blutbild und auf die Chemilumineszenz auswirkt. In Tabelle III.2 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Wie man erkennt, ist die Granulozytenzahl 1 Woche nach dem Ende der Behandlung abgesunken. Das gleiche Verhalten ist für die Leukozyten zu beobachten (Ergebnisse in Tabelle III.2 nicht aufgeführt).

Tabelle III.2. Chemilumineszenz (CL), Zahl der Granulozyten pro μl Blut sowie normierte CL (CL pro 1000 Granulozyten) von männlichen Mäusen, die 7 Tage Trinkwasser ad libitum erhielten, das mit Chlortetracyclinhydrochlorid (0,3 g/l) versetzt war. Jeweils 7, 14 oder 21 nach Ende der Antibiotikum-Behandlung erfolgten die Messungen. Als Kontrollen dienten jeweils gleich alte, aber unbehandelte Tiere. Es sind die Mittelwerte aus der Anzahl η der pro Versuch verwendeten Tiere und die Standardfehler (S. E. M.) angegeben.

Antibiotikum	Zeit nach Ende der Behandlung	n	Granulozyten	CL (Impulse)	normierte CL
- (Kontrolle)	-	9	2 230 \pm 202	20 969 \pm 2 193	10 086 \pm 1 518
+	7 Tage	3	1 531 \pm 224	20 178 \pm 14 023	11 307 \pm 6 628
+	14 Tage	3	2 634 \pm 573	21 801 \pm 4 607	8 701 \pm 897
+	21 Tage	3	2 586 \pm 83	23 923 \pm 6 237	9 162 \pm 2 200

Die entsprechenden Werte betragen 7 Tage nach dem Ende der Chlortetracyclin-Gabe 8865 ± 1099 gegenüber 15451 ± 1902 bei der Kontrolle. Trotz der verminderten Granulozytenzahl ist die CL nicht stark verringert. Dies kommt auch in der normierten CL zum Ausdruck, die höher liegt als bei der Kontrolle. Die nach der Antibiotika-Gabe vorhandene Granulozytenpopulation ist durch die Behandlung in der Bildung der Sauerstoffmetabolite während der Phagozytose nicht beeinträchtigt. Statistisch sind die Unterschiede allerdings nicht abzusichern. Zwei bis drei Wochen nach der Antibiotika-Behandlung werden wieder Normalwerte erreicht (Tabelle III.2). Mindestens drei Wochen wurden für den Versuchsbeginn nach einer Antibiotika-Behandlung eingehalten.

Einfluß einer in vitro Gammabestahlung des Vollbluts auf die Chemilumineszenz

Es wurde untersucht, inwieweit die komplexe biochemische Reaktion, die bei der Phagozytose zu Sauerstoffmetaboliten führt, strahlenempfindlich ist. Für die Versuche wurde Mäuseblut in einer Hank-Salzlösung mit hohen Dosen γ -bestrahlt. In Tabelle III.3 sind die Chemilumineszenz-Ausbeuten nach Bestrahlung mit der Ausbeute bei einer unbestrahlten Blutprobe zusammengestellt.

Wie man den Werten der Tabelle III.3 entnehmen kann, ist die Phagozytose-Aktivität der Granulozyten nicht sehr strahlenempfindlich. Zwar ergibt sich für die CL-Ausbeute eine Abnahme mit der Dosis,

Tabelle III.3. Chemilumineszenz-Ausbeute (CL) von γ -bestrahltem (bei 0°C) Mäuseblut (50 μ l) in Hank-Salzlösung (500 μ l) mit Heparin. Nach der Bestrahlung wurden der Blutprobe Luminol und Zymosan zugesetzt. Die Dosisleistung der Gammastrahlen-Quelle betrug 50 Gy/min. Zum Vergleich wurde unbestrahltes Blut derselben Tiere gleichzeitig gemessen. Bei den CL-Werten handelt es sich um Mittelwerte mit Standardabweichungen von je 6 Tieren bei den bestrahlten und von 18 Tieren bei den unbestrahlten Proben.

Dosis	unbestrahlt	10Gy	100Gy	1000 Gy
CL(cpm)	15069	13 638	11045	8153*
	\pm 4550	\pm 6070	\pm 4067	\pm 2347

*: Unterschied gegen unbestrahlte Kontrolle signifikant mit $P < 0,01$ (t-Test)

jedoch kann erst bei der hohen Dosis von 1000 Gy eine statistisch signifikante Abweichung gegenüber den unbestrahlten Kontrollen nachgewiesen werden. Das sind Dosisbereiche, wie man sie für die strahleninduzierte Inaktivierung von Enzymen und für eine Strahlenschädigung der Zellmembran findet. Die Dosisabhängigkeit der CL ist allerdings nicht exponentiell.

Ganzkörperbestrahlung

Dosis von 1 Gray

In Abbildung III.11 (a) ist der zeitliche Verlauf der Granulozytenzahl, der Chemilumineszenz (CL) und der normierten Chemilumineszenz (CL pro 1000 Granulozyten, s. S. 148) nach einer Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy dargestellt. Wie man der Abb. III.11 (a) entnehmen kann, ist die CL-Ausbeute 12 Stunden bis zu 4 Tagen nach der Bestrahlung erniedrigt, die normierte CL dagegen erhöht. Besonders stark ist die Erhöhung 4 Tage nach der Bestrahlung mit 190 % gegenüber den Kontrollwerten. Abgesehen vom Wert 12 Stunden nach der Bestrahlung liegt im Studentschen t-Test Signifikanz gegenüber den Befunden bei nichtbestrahlten Tieren vor (1 und 2d: $P < 0,01$; 4d: $P < 0,001$). Die Erhöhung der normierten CL ist nicht spezifisch für den verwendeten Mäusestamm. Der gleiche Effekt konnte in einem anderen Mäusestamm (C57B1/6) nach Bestrahlung mit 0,25, 0,5 und 1 Gy ebenfalls beobachtet werden, wobei die normierte CL mit der Dosis anstieg (Hovestadt et al., 1983). In der gleichen Arbeit (Hovestadt et al., 1983) wurde diskutiert, ob dieser Vorgang durch eine Erhöhung der Adenosin-5'-diphosphat (ADP)-Konzentration im Blutserum hervorgerufen wird. Aus der Literatur ist bekannt, daß die ADP-Konzentration im Serum nach Bestrahlung erhöht ist und daß ferner der ADP-Spiegel im Serum die CL-Intensität beeinflußt. Im Rahmen unse-

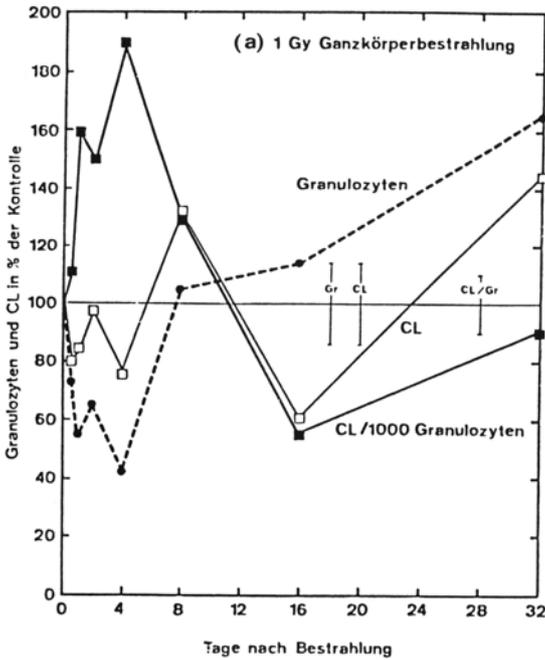
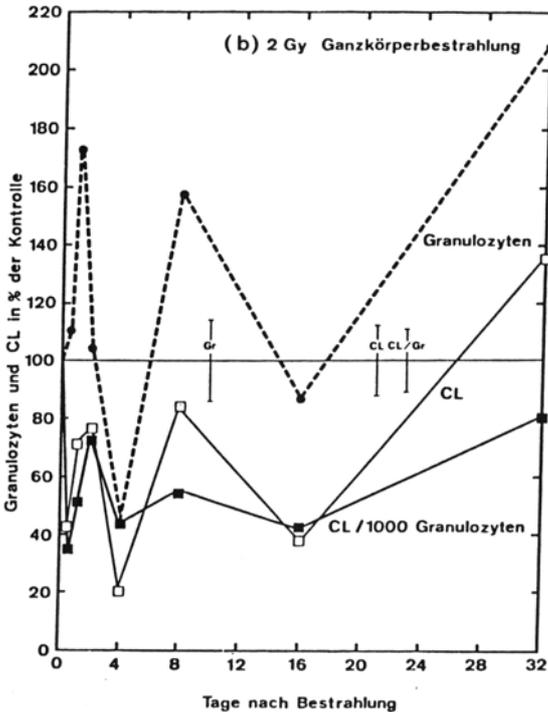


Abb. III.11a Zeitabhängigkeit der Vollblut-Chemilumineszenz (CL), der Granulozytenzahl und der normierten CL (CL/1000 Granulozyten) nach einer Ganzkörperbestrahlung von männlichen Mäusen mit Dosen von 1(a), 2(b), 4(c) und 8 Gray (d). Die Dosisleistung betrug 0,6 Gy/min. Die Werte sind gemittelt aus je 9 Tieren und relativ auf eine jeweils unbestrahlte Kontrollgruppe (=100%) bezogen. Für die Kontrollen sind die Standardfehler des Mittelwertes (S. E. M.) eingetragen. (s. auch Seite 155)



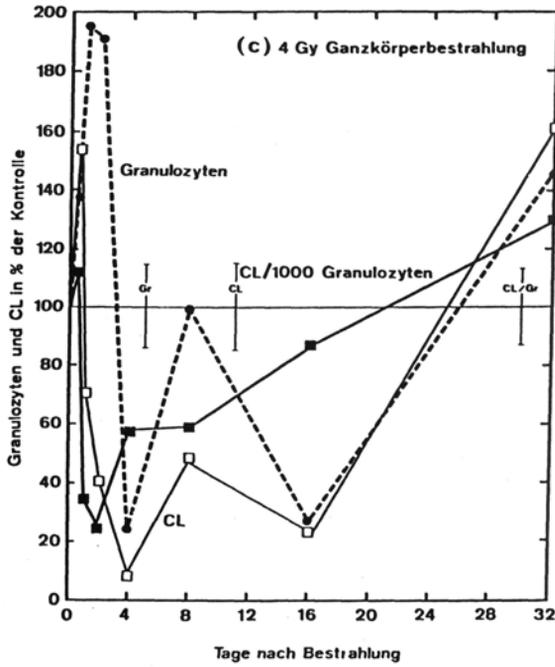


Abb. III.11 c

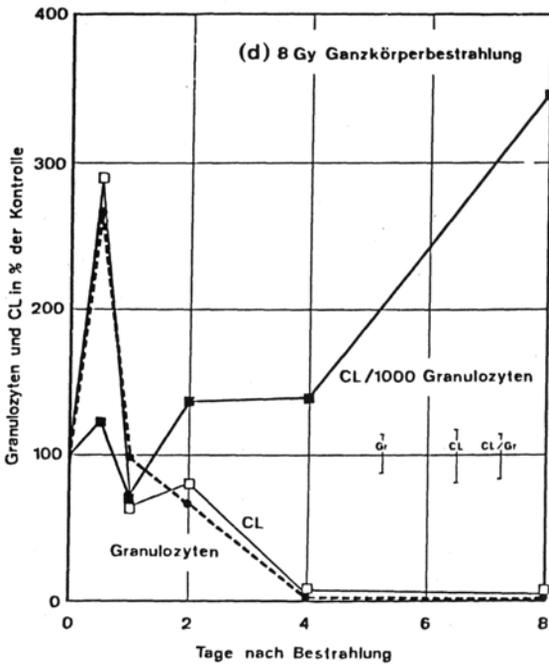
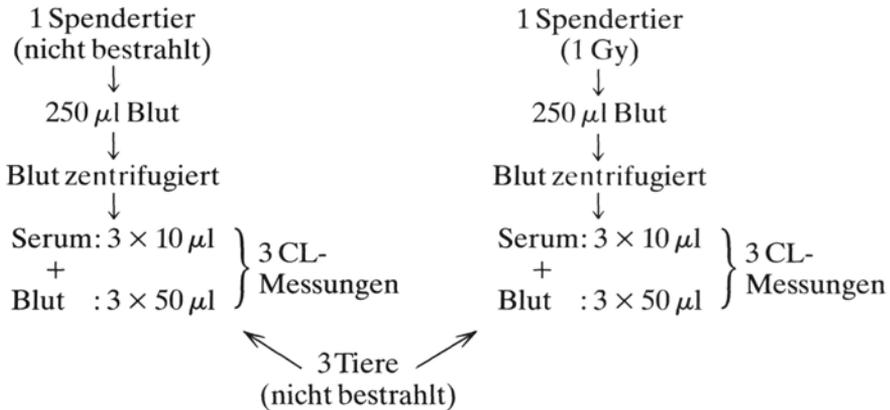


Abb. III.11 d

rer eigenen Untersuchungen haben wir geprüft, ob das Serum oder ein veränderter Kalzium-Spiegel im Blut bestrahlter Mäuse für eine Steigerung der CL-Ausbeute verantwortlich ist.

Einfluß des Blutserums auf die CL

Das folgende Schema zeigt den Versuchsablauf für CL-Messungen mit Blut von nichtbestrahlten Mäusen, dem Serum vom Blut eines bestrahlten bzw. nichtbestrahlten Tieres zugesetzt wurde.



Der in vitro – Zusatz des Blutserums zum Blut anderer Mäuse führte zu keinen Reaktionen, da ein Mäusestamm Verwendung fand, der seit mehr als 50 Jahren im hiesigen Institut als Auszuchtstamm gehalten wird. Hauttransplantate von einem Tier zum anderen werden nicht abgestoßen.

In Tabelle III.4 sind die Ergebnisse über den Einfluß des Blutserums auf die CL-Ausbeute zusammengestellt. Wie zu erkennen ist, führt der Zusatz des Serums bestrahlter Tiere nicht zu einer Erhöhung der CL, sondern sogar zu einer Verminderung. Allerdings ist die Differenz zwischen beiden Mittelwerten statistisch nicht signifikant.

Im Zusammenhang mit den hier diskutierten Fragen ist es von Bedeutung zu wissen, daß Blutserum nur mit außerordentlich geringer Ausbeute zur Chemilumineszenz beiträgt. Andererseits führt Blutserum in alkalischer Luminol-Lösung (die Versuche wurden bei pH 10,7 durchgeführt) ohne Zymosanzusatz zu ähnlichen zeitlichen Verläufen der Chemilumineszenz wie sie in Abb. III.5 dargestellt sind. Ein Unterschied zwischen dem Blutserum unbestrahlter und bestrahlter Mäuse konnte in dieser Versuchsanordnung nicht beobachtet werden.

Tabelle III.4. Chemilumineszenz-Ausbeute (CL) im Blut unbestrahlter Mäuse nach in vitro-Zugabe von 10 µl Serum von bestrahlten bzw. unbestrahlten (Kontrollen) Mäusen zu 50 µl Vollblut unbestrahlter Tiere. Das Serum wurde 2 und 4 Tage nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 1 Gy bzw. nach einer Scheinbestrahlung (Kontrollen) gewonnen (s. Schema des Versuchsablaufs auf S. 156). Die Daten geben jeweils Mittelwerte des Blutes von 18 (2 Tage-Intervall) bzw. 15 (4 Tage-Intervall) Empfängertieren wieder.

Dosis Zeit zw. Bestrahlung Granulozytenzahl/µl CL (Imp. /min) und Blutentnahme

0	2 Tage	3572 ± 342*	32344 ± 3422*
1Gy	2 Tage	3572 ± 342	24493 ± 1915
0	4 Tage	3550 ± 381	34753 ± 4481
1Gy	4 Tage	3550 ± 381	28800 ± 3515

*: S.E.M. = SD/n^{0,5}

Einfluß des Calciums im Blutserum auf die CL

Nach Suzuki et al. (1985) wird die Bildung von Superoxid-Anionen (O₂⁻) durch Granulozyten bei Zusatz von Ca²⁺ verstärkt. Um zu prüfen, ob die nach Ganzkörperbestrahlung mit 1 Gy beobachtete verstärkte Chemilumineszenz pro Granulozyt auf einen erhöhten Calcium-Spiegel im Blutserum zurückführen ist, wurden vergleichende Untersuchungen bei bestrahlten und unbestrahlten Tieren durchgeführt. In Tabelle III.5 ist das Ergebnis für 1 Gy 4 Tage nach der Bestrahlung aufgeführt. Wie man sieht, ist zwar der Calcium-Spiegel gegenüber der unbestrahlten Kontrollgruppe leicht erhöht. Der Unterschied liegt aber im Bereich der Fehlerbreite, wie auch an dem Ergebnis bei einer Bestrahlung mit 4 Gy 4Tage nach der Bestrahlung abzulesen ist. In Tabelle III.5 sind weitere Ergebnisse mit anderen Strahlendosen aufgelistet.

Tabelle III.5. Calcium-Konzentration im Blutserum bestrahlter und unbestrahlter Mäuse. Die Bestimmung erfolgte spektralphotometrisch über die Komplexbildung des Ca⁺⁺ mit o-Kresolphthalein-Komplexon (Boehringer, Mannheim).

Dosis	Tage nach Bestrahlung	Ca ⁺⁺ -Konz. in mg/dl
0 (Kontrolle)	-	8,38 ± 0,53*
1Gy	4	8,82 ± 0,40
2Gy	4	7,73 ± 0,46
4Gy	1	7,72 ± 0,18
4Gy	4	8,84 ± 0,34
6Gy	4	7,95 ± 1,36

*: Standardabweichung

Die hier untersuchten Faktoren sind offensichtlich für die verstärkte Lumineszenz bei Bestrahlung mit einer Dosis bis zu 1 Gy nicht verantwortlich. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß unter diesen Bestrahlungsbedingungen andere Substanzen auftreten, die für diesen Vorgang von Bedeutung sind. Wir vermuten jedoch, daß es Subpopulationen bei den Granulozyten der Maus mit unterschiedlicher Leistungsfähigkeit bei der Bildung von Sauerstoffmetaboliten gibt (Mönig und Konermann, 1993). Bei Granulozyten im Blut von Menschen mit Infektionen hat man solche Subpopulationen nachweisen können (Bass et al., 1986). Gemessen wird bei der Chemilumineszenz der Mittelwert über alle Subpopulationen. Treten durch eine Störung eine oder mehrere Fraktionen hervor, so kann es, bezogen auf den einzelnen Granulozyten, zu einer Erniedrigung oder Erhöhung der CL-Meßwerte kommen. Ob die Stärke des Reaktionsvermögens mit dem Grad der zellulären Reifung der Granulozyten einhergeht, ist bisher nicht bekannt.

Dosisbereich von 2 bis 8 Gy

Zeitabhängigkeit

In den Abbildungen III.11 (b) bis III.11 (d) sind die Ergebnisse nach Ganzkörperbestrahlungen mit 2(b) und 4 Gy (c) im Zeitbereich von 12 Stunden bis zu 32 Tagen sowie für eine Dosis mit 8 Gy (d) im Bereich von 12 Stunden bis zu 8 Tagen nach der Bestrahlung dargestellt. Bei der hohen Dosis von 8 Gy, dies entspricht etwa einer LD 90/30d für den von uns verwendeten Tierstamm (Mönig et al., 1986), überleben die meisten Tiere eine Zeit von 12 Tagen nicht. In den Darstellungen der Abbildungen III. 11 ist der oszillierende Verlauf der Blutparameterwerte gut zu erkennen. Die überschießenden Reaktionen sind auf kompensatorisch regenerative Prozesse zurückzuführen (Fliedner, 1973). Den Verläufen ist zu entnehmen, daß jeweils am 4. Tag die niedrigsten Werte für die Zahl der Granulozyten und für die CL-Ausbeute vorliegen. Dieses Verhalten kann auch bei einer Dosis mit 3 Gy beobachtet werden. Die Werte für 3 Gy sind in der Abb. III.13 für die Dosisabhängigkeit mit enthalten. Im Falle der Ganzkörperbestrahlung mit 8 Gy findet allerdings bis zum 8. Tag keine Erholung mehr statt.

Obwohl die CL des Vollbluts im wesentlichen auf die Granulozyten zurückzuführen ist (s. Einführung), korrespondieren in einigen Fällen die CL-Ausbeuten nicht mit den Granulozytenzahlen. Zum Teil sind die beiden Parameter sogar gegenläufig. Die statistische Aufarbeitung dieses Verhaltens mit Hilfe der Korrelationsanalyse wird weiter unten beschrieben. Es fällt auf, daß die CL-Werte im Gegensatz zu den Granu-

lozytenzahlen im Bereich von 1 bis zu 16 Tagen nach der Bestrahlung immer unterhalb der Werte der Kontrollen liegen. Für die Frage einer Biologischen Dosimetrie ist dieses Verhalten der CL als günstig einzustufen. Die normierte CL stellt ein Maß für die mittlere Leistungsfähigkeit der Granulozyten hinsichtlich der Erzeugung von Sauerstoffmetaboliten dar. Besonders bei überschießenden Reaktionen der Granulozytenzahl ist zu erkennen, daß die normierte CL verringert ist. Dieses Verhalten läßt darauf schließen, daß die neu ins Blut eintretenden Granulozyten weniger Sauerstoffmetabolite erzeugen als dies normalerweise der Fall ist. Eine Erklärung für diese Leistungsverminderung gibt es bisher nicht.

Korrelation zwischen Granulozytenzahl und CL

Wie bereits oben bemerkt, gibt es in viele Fällen für die gemessenen Chemilumineszenz-Werte eine gute Übereinstimmung mit den Granulozytenzahlen. In anderen Fällen fehlt jedoch diese Korrespondenz. Mit Hilfe der Korrelationsanalyse wurde dieses Verhalten näher untersucht.

In Tabelle III.6 sind die Korrelationskoeffizienten r zwischen der Granulozytenzahl und der Lichtausbeute der Chemilumineszenz für ganzkörperbestrahlte Tiere und für die zugehörigen Kontrollgruppen aufgelistet. In Abb. III.12 sind die r -Werte der Tabelle III.6 nach Gruppen zu Häufigkeitsverteilungen für unbestrahlte (Kontrollen) und für bestrahlte Mäuse dargestellt. Für die Häufigkeitsverteilung der Korrelationskoeffizienten bei den bestrahlten Tieren wurde nicht zwischen den Strahlendosen und der Zeit zwischen Bestrahlung und Blutentnahme unterschieden. Wie aus Abb. III.12 zu erkennen ist, führt die Bestrahlung zu einer Entkoppelung der Korrelation zwischen der Granulozytenzahl und der Lichtausbeute der Chemilumineszenz. Obwohl es auch bei den nichtbestrahlten Kontrolltieren negative Korrelationskoeffizienten gibt (6% aller Gruppen), steigt die Anzahl der negativen r -Werte bei den bestrahlten Tieren auf 33 % an. Negative Korrelationskoeffizienten bedeuten, daß die CL mit abnehmender Granulozytenzahl ansteigt. Aus den Daten der Tabelle III.6 läßt sich entnehmen, daß der Trend für negative r -Werte zunimmt, je höher die Strahlendosen und je länger die Zeiten nach der Bestrahlung sind. Die Korrelationsanalyse läßt auf verschiedene Populationen von Granulozyten mit unterschiedlicher Kapazität in der Bildung von Sauerstoffmetaboliten schließen.

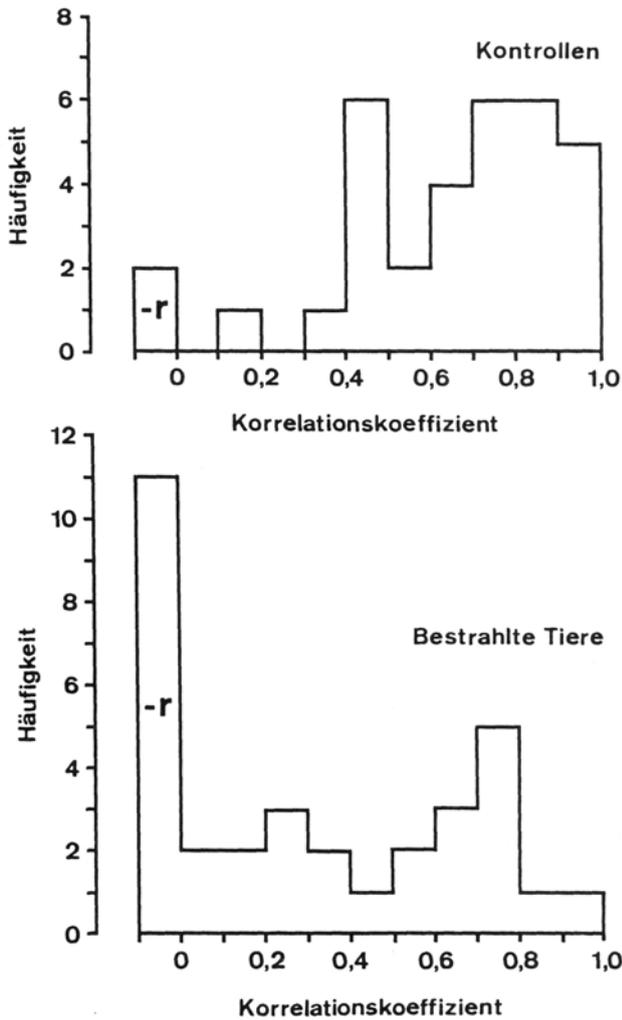


Abb. 111.12 Häufigkeitsverteilungen der Korrelationskoeffizienten r zwischen der Granulozytenzahl und der Lichtausbeute der Chemilumineszenz im Blut unbestrahlter (Kontrollen) und ganzkörperbestrahlter Mäuse. Die Häufigkeitsverteilungen wurden aus den Daten der Tabelle III.6 gewonnen, wobei die r -Werte für die bestrahlten Tiere unabhängig von der Dosis und dem Zeitpunkt der Blutentnahme nach der Bestrahlung zusammengefaßt wurden.

Tabelle III.6. Korrelationskoeffizient r zwischen Granulozytenzahl und der Lichtausbeute der Chemilumineszenz im Blut unbestrahlter (Kontrollen, K) und ganzkörperbestrahlter (B) Mäuse. Die Korrelationskoeffizienten wurden für jede Gruppe aus jeweils 9 Tieren ermittelt.

Dosis	Zeit zwischen Bestrahlung und Blutentnahme						
	12 Stunden	1 Tag	2 Tage	4 Tage	8 Tage	16 Tage	32 Tage
1 Gy	K: 0,9714 B: 0,7779	K: 0,9352 ^{a)} B: 0,5132	K: 0,8536 B: 0,7362	K: 0,6938 B: 0,9708	K: -0,6548 B: 0,7076	K: 0,7304 B: 0,1143	K: 0,7072 ^{a)} B: -0,2906
2 Gy	K: 0,8269 B: 0,6117	K: 0,4085 B: 0,6835	K: 0,8006 ^{a)} B: 0,2601	K: 0,9533 ^{b)} B: 0,0055	K: 0,8460 B: 0,7318	K: 0,5595 B: 0,0029	K: 0,5352 B: 0,3858
3 Gy	K: 0,4651 B: 0,6577	K: 0,9269 B: 0,8511	K: 0,3182 B: -0,1909	K: 0,6933 B: 0,5741	K: 0,7097 ^{a)} B: -0,3158	K: 0,6079 B: 0,3691	K: 0,7975 ^{a)} B: -0,1381
4 Gy	K: 0,8522 B: 0,7335	K: 0,9457 ^{b)} B: 0,2499	K: 0,4475 B: 0,1858	K: 0,6246 B: -0,2891	K: 0,7451 ^{a)} B: -0,0788	K: 0,4797 B: -0,2331	K: 0,1791 B: -0,1059
8 Gy	K: 0,8309 ^{b)} B: -0,3179	K: 0,4933 B: 0,4122	K: 0,4338 B: -0,3931	K: -0,0821 B: 0,2307	K: 0,7341 ^{a)} B: -0,4532	— —	— —

a) Differenz zwischen Kontrolle und Bestrahlten mit $P < 0,05$ gesichert

b) Differenz zwischen Kontrolle und Bestrahlten mit $P < 0,01$ gesichert

Dosisabhängigkeit

Für die biologische Dosimetrie ist die Dosisabhängigkeit der betrachteten Wirkung von großer Bedeutung. Deshalb wurden für den 4. Tag nach der Bestrahlung die entsprechenden Blutparameter über der Dosis in Abb. III.13 aufgetragen. Für diesen Zeitpunkt liegen die niedrigsten

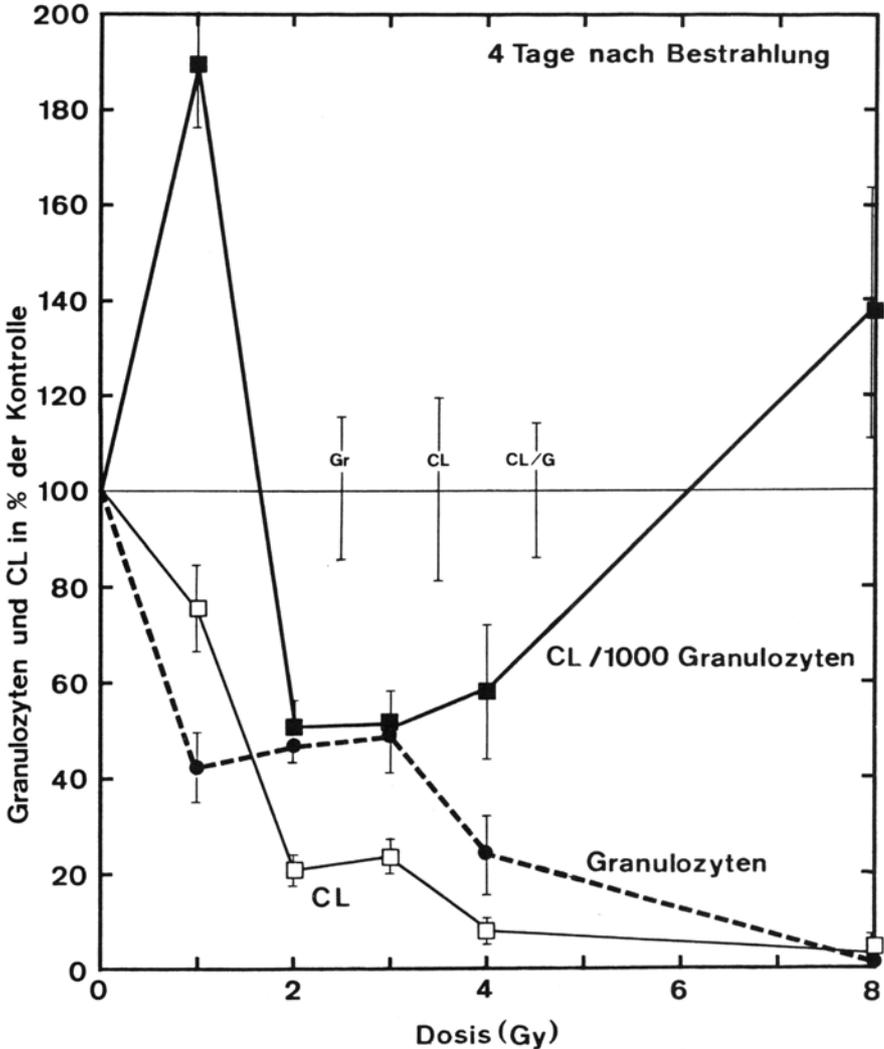


Abb. 111.13 Dosisabhängigkeit der Vollblut-Chemilumineszenz (CL), der Granulozytenzahl und der normierten CL (CL/1000 Granulozyten) 4 Tage nach einer Ganzkörperbestrahlung von männlichen Mäusen bei einer Dosisleistung von 0,6 Gy/min. Die Werte sind gemittelt aus je 9 Tieren und relativ auf eine jeweils unbestrahlte Kontrolle (= 100 %) bezogen. Die Balken geben die Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) an.

Werte für die Granulozytenzahlen und für die CL vor (s. Abb. III.IIa bis d). Außerdem stimmt in diesem Fall der Verlauf beider Parameter mit der Dosis weitgehend überein. Die Dosisabhängigkeit für die CL folgt im wesentlichen einem exponentiellen Verlauf (Abb. III. 14).

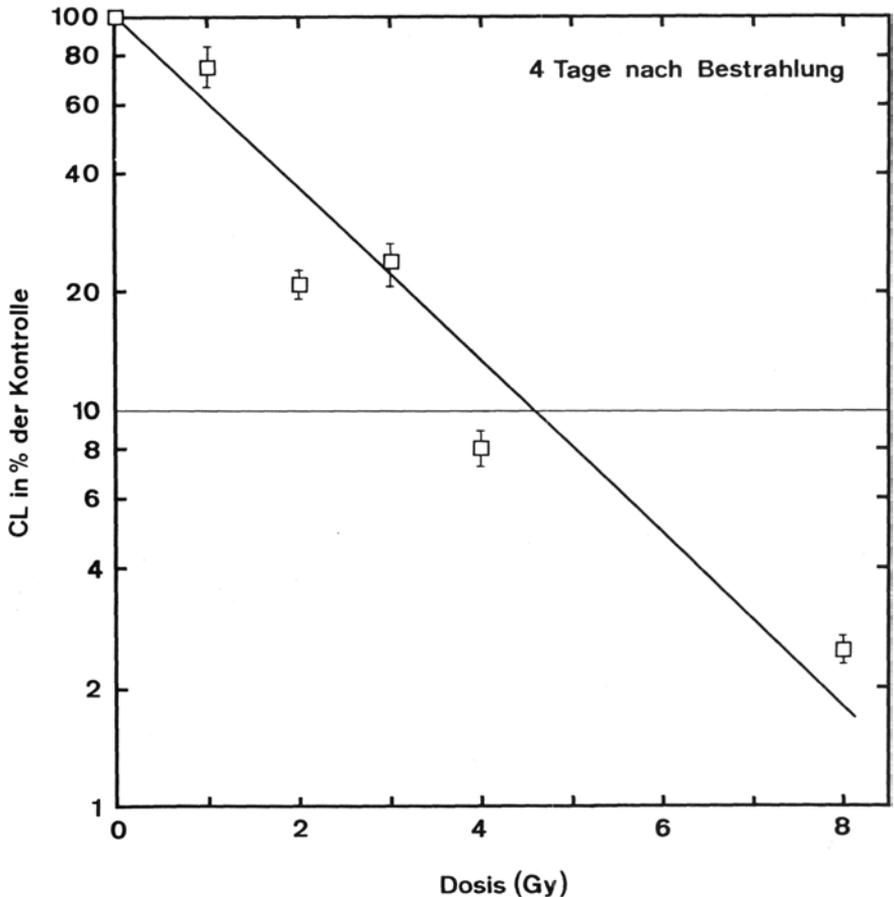


Abb. III.14 Dosisabhängigkeit der Chemilumineszenz im verdünnten Vollblut von Mäusen 4 Tage nach Ganzkörperbestrahlung. Darstellung der Meßwerte aus Abb. III.13 im halblogarithmischen Raster.

Einfluß der Dosisleistung bei Ganzkörperbestrahlung

Eine geringere Dosisleistung führt durch Zeitfaktoreffekt zu einer Verringerung der Strahlenwirkung. Dieser Vorgang sollte sich in den Meß-

werten niederschlagen. Eine geringere Dosisleistung spielt beim radioaktiven Fallout und bei inkorporierten radioaktiven Stoffen eine Rolle.

In Abb. III.15 ist der zeitliche Verlauf der Granulozyten, der CL und der normierten CL nach einer Ganzkörperbestrahlung von Mäusen mit

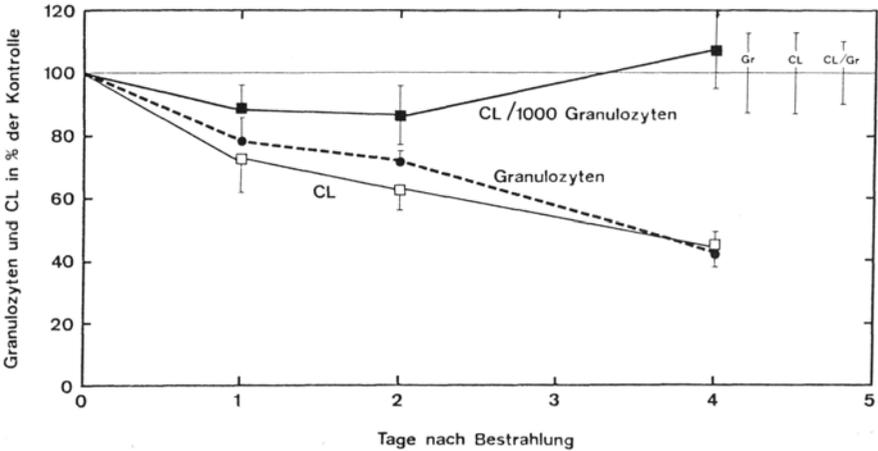


Abb. III.15 Zeitabhängigkeit der Vollblut-Chemilumineszenz (CL), der Granulozytenzahl und der normierten CL (CL/1000 Granulozyten) nach einer Ganzkörperbestrahlung von männlichen Mäusen mit einer Dosis von 2 Gy bei einer Dosisleistung von 0,02 Gy/min. Die Werte sind gemittelt aus je 9 Tieren und relativ auf eine jeweils unbestrahlte Kontrollgruppe (= 100 %) bezogen. Für die einzelnen Punkte sind die Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) eingetragen.

2 Gy bei der geringen Dosisleistung von 0,02 Gy/min dargestellt. Deutlich ist der fast parallele Verlauf der CL-Werte mit den Granulozyten-Werten zu erkennen. Das heißt, die Verminderung der Granulozytenzahlen wirkt sich in gleicher Weise auf die CL-Ausbeute aus. Ein Vergleich mit Abb. III.11b zeigt den gewaltigen Unterschied im Verhalten der beobachteten Parameter bei hoher und bei niedriger Dosisleistung. Für einen besseren Vergleich sind in Abb. III. 16 die Ergebnisse für die beiden Dosisleistungen einander gegenübergestellt. Die Tiere erhielten jeweils eine Ganzkörperbestrahlung mit 2 Gray. Bei der höheren Dosisleistung (0,6 Gy/min) machen sich bei den Granulozyten am 1. und 2. Tag nach der Bestrahlung überschießende Reaktionen bemerkbar, die bei Einwirkung einer gleichen Dosis von 2 Gray mit geringerer Dosisleistung (0,02 Gy/min) noch nicht auftreten. Deshalb sind hier die Granulozytenwerte geringer als bei der höheren Dosisleistung. Auffallend ist jedoch, daß die Werte der normierten CL im Falle der geringeren Dosisleistung größer sind als bei der höheren Dosisleistung. Dieses Verhalten deutet darauf hin, daß eine der Funktionen der Granulozy-

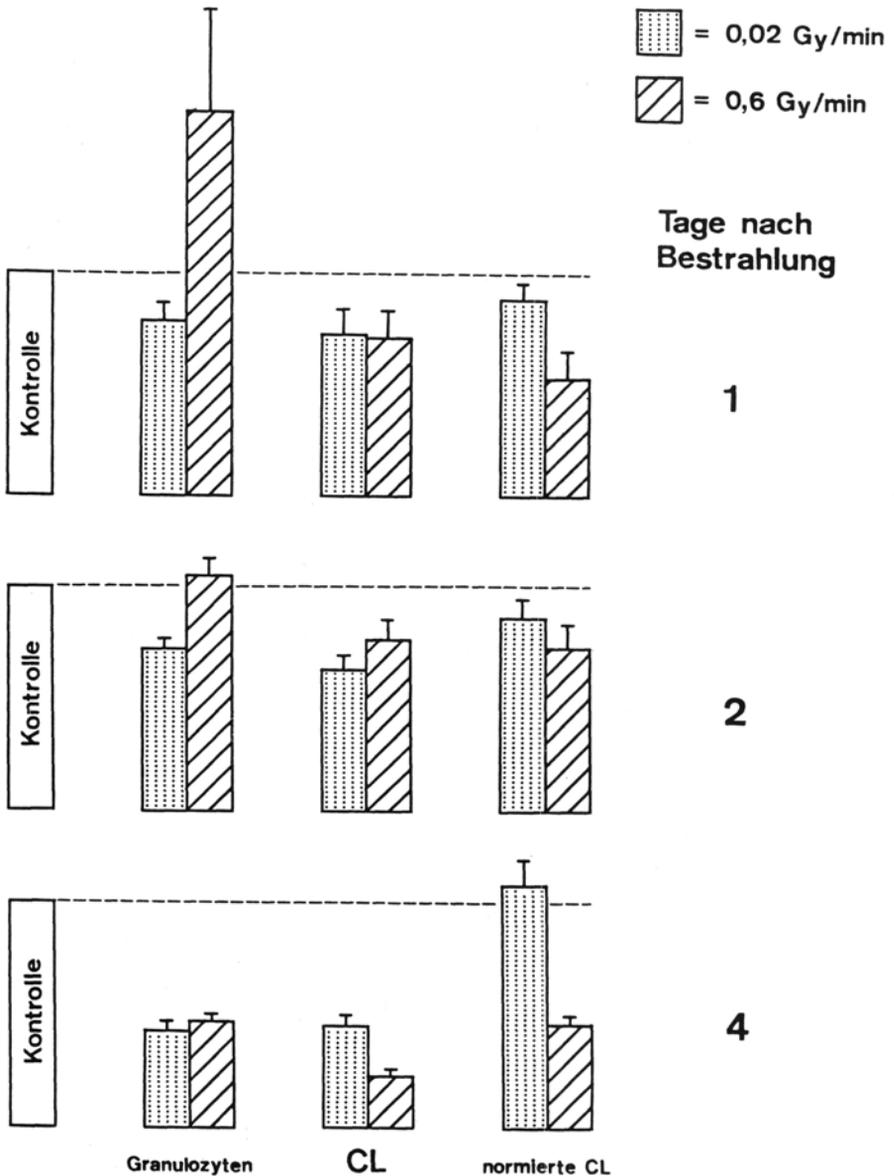


Abb. 111.16 Vergleich der Werte der Granulozyten und der Chemilumineszenz (CL) nach Ganzkörperbestrahlung von Mäusen mit 2 Gray bei unterschiedlicher Dosisleistung. Die Säulen für die Kontrollen sind für die angegebenen Blutwerte willkürlich gleich hoch gesetzt. Die Markierungen auf den Säulen geben die Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) an.

ten, nämlich die Produktion von Sauerstoffmetaboliten während der Phagozytose, bei geringerer Dosisleistung weniger gestört ist.

Die besondere Situation des Tages 4 nach der Bestrahlung zeigt sich auch hier. Während die Granulozytenzahlen für beide Dosisleistungen weitgehend gleich sind, macht sich die geringere Dosisleistung in einer höheren CL bemerkbar. Das gleiche Verhalten konnte auch bei einer Dosis von 4 Gray beobachtet werden (in Abb. III.16 nicht eingezeichnet). Während die Granulozytenzahlen für beide Dosisleistungen völlig gleich waren, ergaben sich für die CL jeweils bezogen auf eine unbestrahlte Kontrolle (100 %) die Werte $22,5 \pm 4,4 \%$ bei 0,02 Gy/min und $8,0 \pm 0,9 \%$ bei 0,6 Gy/min. Am 4. Tag nach der Bestrahlung kommt demnach der Zeitfaktoreffekt in dem Parameter der Chemilumineszenz zum Ausdruck.

In Abb. III.17 ist die Dosisabhängigkeit am 4. Tag nach der Bestrahlung für die Granulozyten-Werte, die CL-Ausbeute und die normierte CL dargestellt. Ein Versuch mit einer Dosis von 8 Gy wurde wegen der langen Bestrahlungszeit von fast 7 Stunden und der damit verbundenen

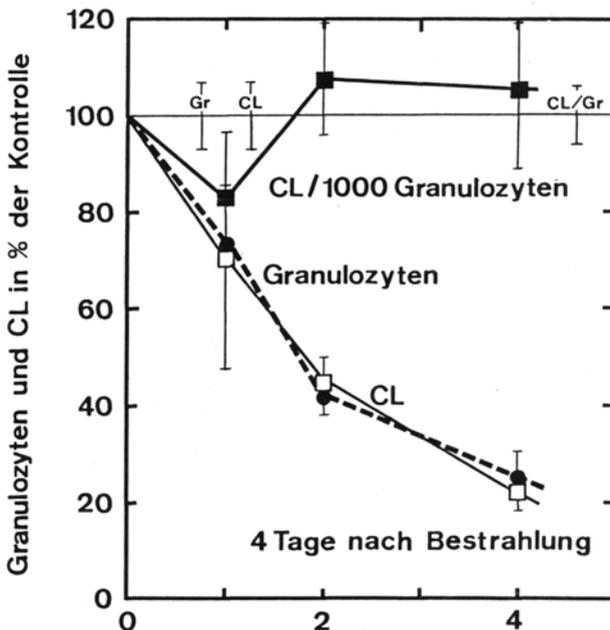


Abb. III.17 Dosisabhängigkeit der Vollblut-Chemilumineszenz (CL), der Granulozytenzahl und der normierten CL (CL/1000 Granulozyten) 4 Tage nach einer Ganzkörperbestrahlung von männlichen Mäusen bei einer Dosisleistung von 0,02 Gy/min. Die Werte sind gemittelt aus je 9 Tieren und relativ auf eine jeweils unbestrahlte Kontrolle (= 100 %) bezogen. Die Balken geben die Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) an.

zeitlichen Verschiebung der Blutentnahme, die wiederum zu tageszeitlichen Schwankungen in den Blutwerten führt, nicht durchgeführt. Bei einer Dosis von 1 Gray fehlt die verstärkte Chemilumineszenz, die mit Hilfe der normierten CL bei höherer Dosisleistung beobachtet werden konnte (Abb. III.13). Wie aus der Darstellung der Abb. III.17 ersichtlich ist, ergibt sich am 4. Tag nach der Bestrahlung ein praktisch identischer dosisabhängiger Verlauf für die Granulozytenzahlen und die CL-Werte. Beide Parameter folgen einem exponentiellen Verlauf. In Abb. III.18 ist

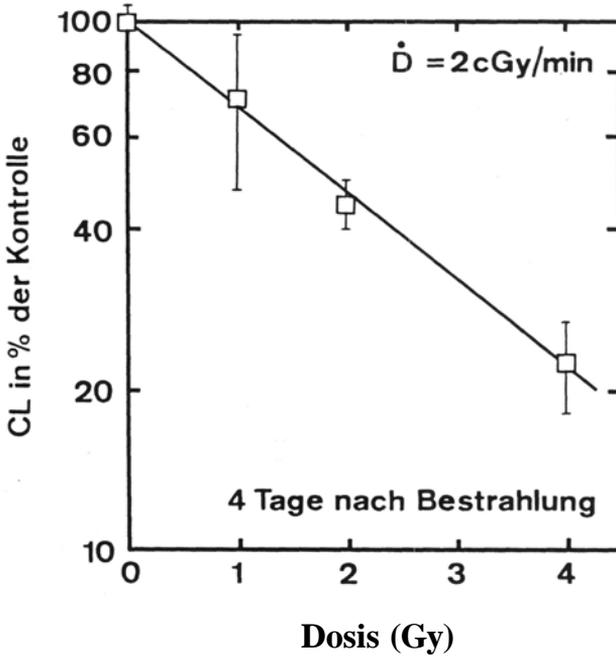


Abb. III.18 Dosisabhängigkeit der Chemilumineszenz im verdünnten Vollblut von Mäusen 4 Tage nach Ganzkörperbestrahlung bei einer Dosisleistung von 0,02 Gy/min. Darstellung der Werte aus Abb. III.17 im halblogarithmischen Raster.

der dosisabhängige Verlauf für die CL im halblogarithmischen Raster aufgetragen. Vergleicht man die Steigung (- 0,377) dieser Dosisabhängigkeit mit der Steigung (- 0,504) aus Abb. III. 14 für die höhere Dosisleistung, so ergibt sich als Zeitfaktor der Wert von 1,34. Dieses Dosisverhältnis läßt sich mit dem für die LD 50:30d bei Mäusen errechneten Zeitfaktor von 1,27 vergleichen, wenn man für die Dosisleistungen 0,6 Gy/min und 0,02 Gy/min Daten verwendet, die Casarett (1968) angegeben hat.

Teilkörperbestrahlung

Eine wichtige Frage bei einer Biologischen Dosimetrie ist das Verhalten der Meßwerte des betreffenden Verfahrens bei einer Teilkörperbestrahlung. Es wurden deshalb in die Untersuchungen Versuche einbezogen, bei denen nur etwa eine Körperhälfte der Mäuse bestrahlt wurde. Die untere Hälfte der Körper war mit Blei abgedeckt (Abb. III.4). Mit dieser Anordnung wurden etwa 50 % des Knochenmarks bestrahlt (s.S. 145).

In den Abbildungen III.19(a) und (b) sind die Meßwerte bezogen auf unbestrahlte Kontrollen in Abhängigkeit von der Dosis für den 2. und

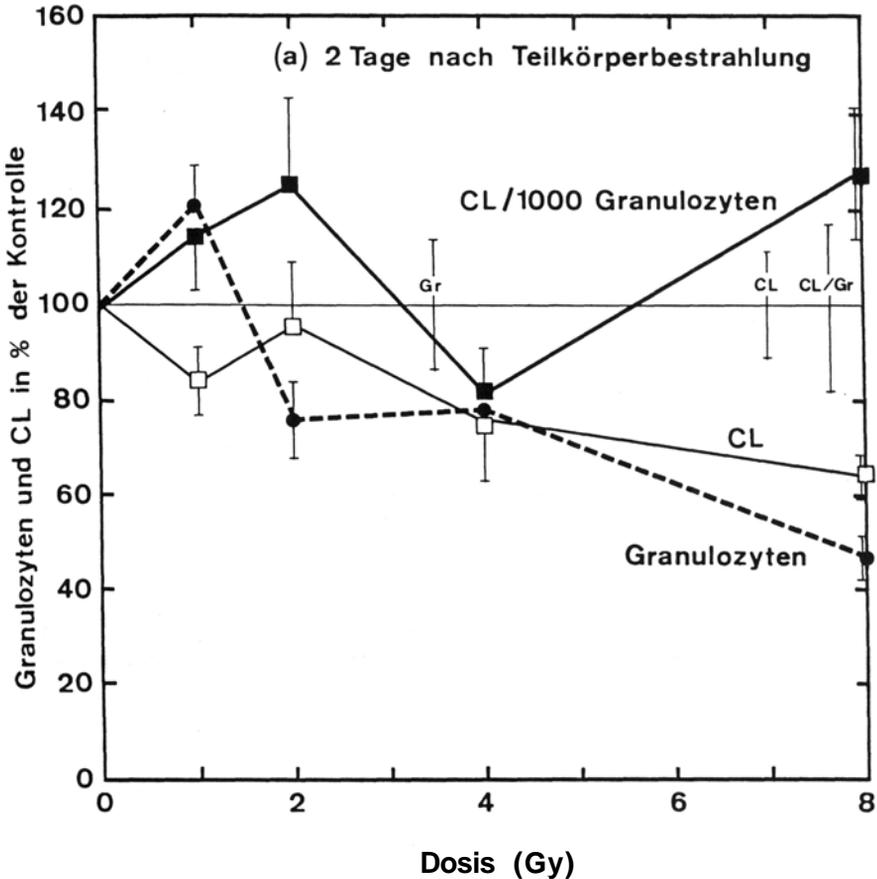


Abb. 111.19 Dosisabhängigkeit der Vollblut-Chemilumineszenz (CL), der Granulozytenzahl und der normierten CL (CL/1000 Granulozyten) 2 (a) und 4 Tage (b) nach einer Teilkörperbestrahlung von männlichen Mäusen bei einer Dosisleistung von 0,6 Gy/min. Die Werte sind gemittelt aus je 9 Tieren und relativ auf eine jeweils unbestrahlte Kontrolle (= 100 %) bezogen. Die Balken geben die Standardfehler des Mittelwerts (S. E.M.) an. (s. auch Seite 169)

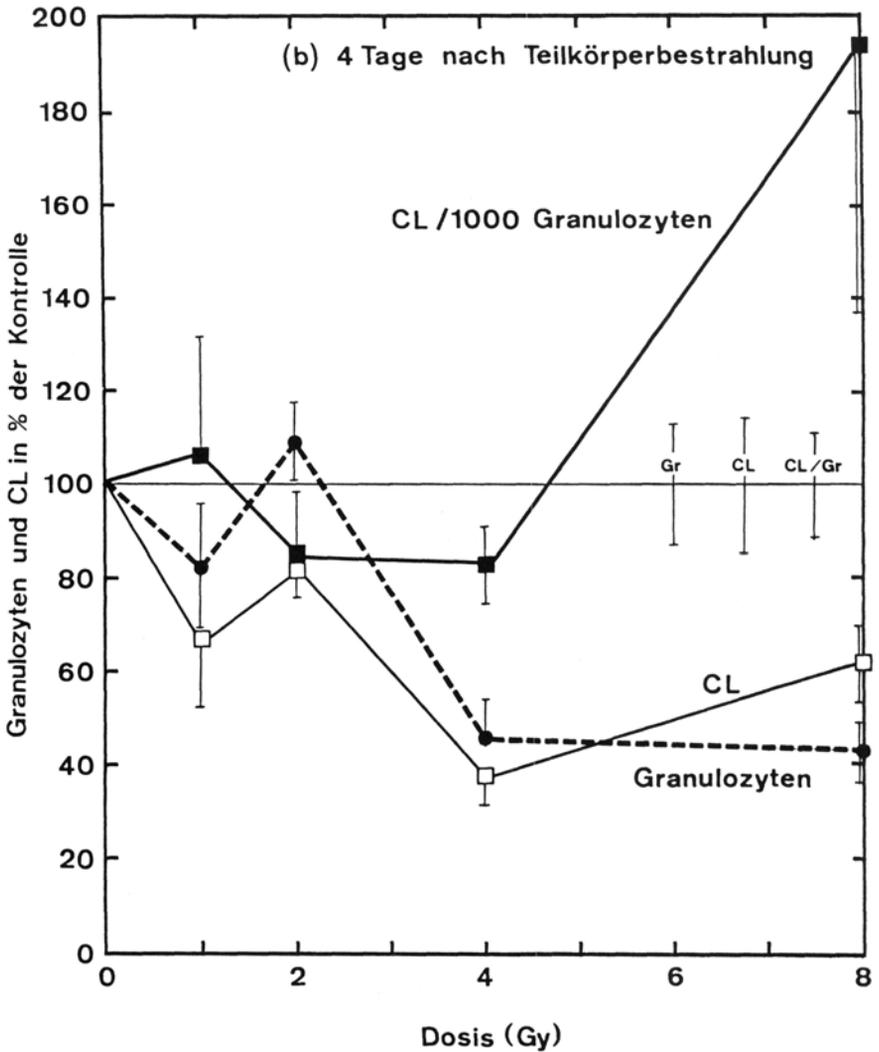


Abb. III.19 b

4. Tag nach der Bestrahlung dargestellt. Bei Strahlendosen von 1 und 2 Gy ist eine leicht erhöhte normierte CL (abgesehen vom 4. Tag nach Bestrahlung mit 2 Gy) zu beobachten. Dieses Ergebnis ist nach den Befunden mit 1 Gy Ganzkörperbestrahlung nicht ganz unerwartet (Abb. III.11a). Andererseits ist zu erkennen, daß für die Höhe dieses Effekt nicht die Volumendosis ausschlaggebend ist, sonst müßten mit 2 Gy Teilkörperbestrahlung ähnliche Ergebnisse beobachtet werden, wie mit 1 Gy Ganzkörperbestrahlung. Entsprechende Überlegungen gelten

für 8 Gy Teilkörperbestrahlung. Bei 4 Gy Ganzkörperbestrahlung (Abb. III.11c) findet man keine Erhöhung der normierten CL. Dagegen ist bei einer Ganzkörperbestrahlung mit 8 Gy die gesteigerte Ausbeute der Chemilumineszenz pro Granulozyt zu beobachten (Abb. III.11d). Demnach korreliert in diesem Dosisbereich die normierte CL eher mit der Höhe der Dosis als mit der Höhe der Volumendosis. Gleiche Betrachtungen gelten für die gemessene Granulozytenzahl und die CL. Interessant ist, daß im untersuchten Dosisbereich die CL unterhalb der Kontrollwerte bleibt, was für die Granulozytenzahlen nicht zutrifft.

Zum besseren Vergleich sind in Abb. III.20 die Ergebnisse für den 4. Tag nach der Ganzkörper- und Teilkörper-Bestrahlung mit Dosen von 2, 4 und 8 Gray dargestellt. Wie man sieht, spiegelt sich sowohl in den Granulozytenzahlen, als auch in den CL-Ausbeuten die geringere Strahlenbelastung der Teilkörperbestrahlung gut wider. Errechnet man aus den relativen CL-Werte am 4. Tag nach der Teilkörperbestrahlung für die Dosen 1, 2 und 4 Gy eine exponentielle Funktion mit dem Anfangswert 100 für die Dosis Null und vergleicht die erhaltene Steigung von $-0,226$ mit der aus Abb. 14 für die Ganzkörperbestrahlung ($-0,504$), so erhält man ein Verhältnis von 1:2,2. Die Umkehrung dieses Verhältnisses gibt an, um welchen Faktor (hier 2,2) die Dosis bei der Teilkörperbestrahlung erhöht werden muß, um zu einem gleichen CL-Wert zu kommen, wie bei der Ganzkörperbestrahlung. Mit anderen Worten: Die CL-Werte stellen für den Dosisbereich zwischen 0 und 4 Gy die Situation der Bestrahlung von 50 % Knochenmark gut dar. Gleichzeitig muß darauf hingewiesen werden, daß diese Aussage für eine Teilkörperdosis von 8 Gy nicht mehr zutrifft.

Einfluß einer Cystamin-Gabe

Cystamin, ein Disulfid des Mercaptoethylamins, gehört zu den experimentell am gebräuchlichsten Strahlenschutzsubstanzen. Cystamin wird bei den hier beschriebenen Versuchen stellvertretend für eine Reihe schwefelhaltiger Strahlenschutzsubstanzen verwendet. Bei der Untersuchung des Einflusses von Cystamin auf die CL-Ausbeute geht es um zwei Fragestellungen. Zum einen ist zu prüfen, in welcher Weise diese Substanz die Blutwerte auch ohne Bestrahlung beeinflusst. Solche Abweichungen können die Abschätzung der Dosis mit Hilfe des Chemilumineszenz-Verfahrens verfälschen. Zum anderen kann bei bestrahlten Tieren untersucht werden, ob ein Teilbereich des Hämopoese-Systems durch Cystamin bei einer Strahleneinwirkung geschützt werden kann.

In Tabelle III.7 sind die Ergebnisse einer Behandlung von Mäusen mit Cystamin auf Blutwerte und die Chemilumineszenz-Ausbeute zusam-

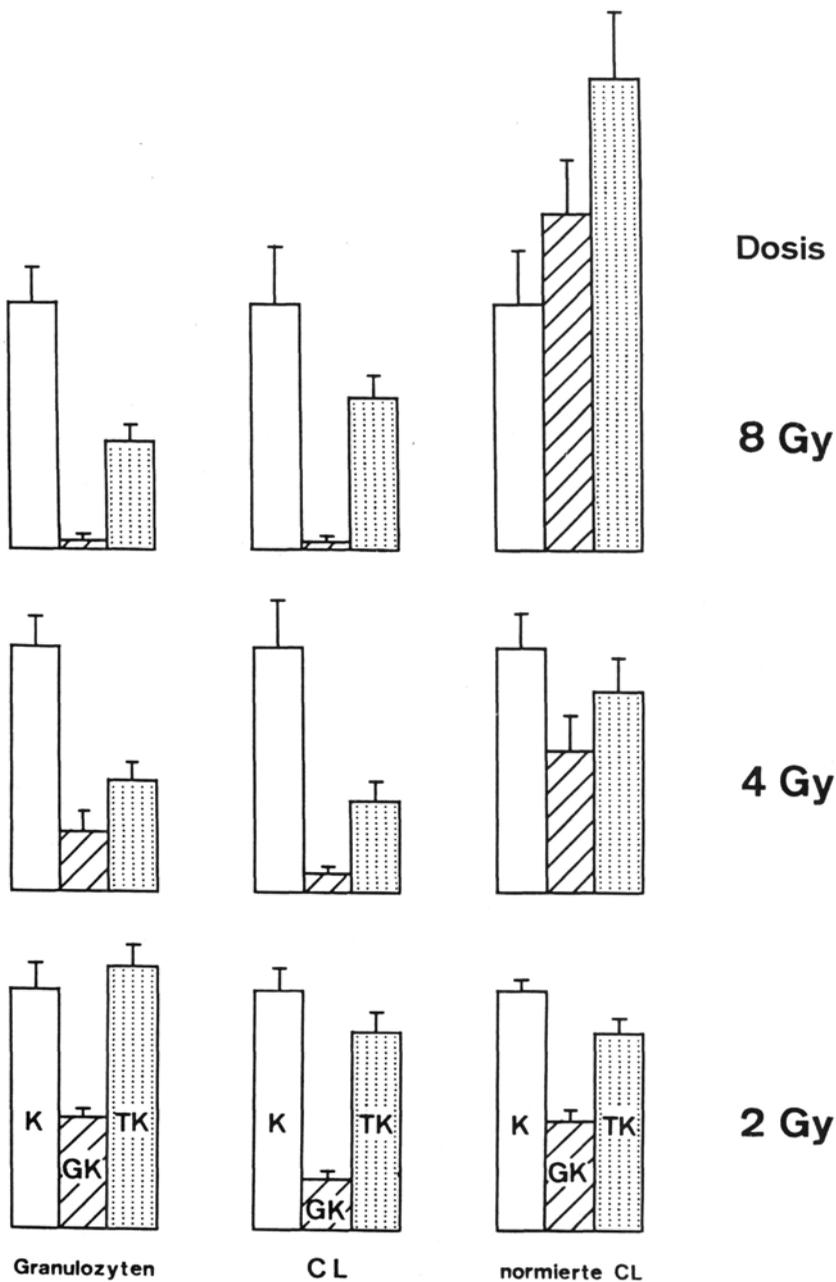


Abb. III.20 Vergleich der Werte der Granulozyten und der Chemilumineszenz (CL) 4 Tage nach Ganzkörper (GK)- oder Teilkörper (TK)-Bestrahlung von Mäusen. Die Markierungen auf den Säulen geben die Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.) an. K = unbestrahlte Kontrollen.

mengestellt. Ein Vergleich mit den Kontrollgruppen zeigt, daß in den meisten Fällen die Werte geringer sind als bei den mit physiologischer NaCl-Lösung behandelten Tieren. Die Abweichungen sind jedoch statistisch nicht signifikant. Die seinerzeit – allerdings bei einem anderen Mäusestamm – beobachtete Erhöhung der Leukozytenzahl um 30 % und der CL um sogar 115 % 48 Stunden nach Cystamin-Gabe (Hovestadt et al., 1983) konnte bei den hier durchgeführten Versuchen nicht bestätigt werden. Andererseits berichten Smith et al. (1965), daß 24 und 48 Stunden nach Gabe von Mercaptoethylamin (Cysteamin) die Granulozyten-Werte bei Mäusen um 25 % erniedrigt waren. Interessant ist, daß sich die Cystamin-Behandlung praktisch nicht auf die normierte

Tabelle III.7. Relative Werte der Leukozyten, Granulozyten, Chemilumineszenz-Ausbeute (CL) und normierten CL (= CL/1000 Granulozyten) von unbestrahlten männlichen Mäusen 2 und 4 Tage nach i. p.-Injektion von 150 mg Cystamin pro kg Körpergewicht. Die Kontrollgruppen erhielten eine entsprechende Flüssigkeitsmenge an physiologischer NaCl-Lösung. Die Mittelwerte aus der Tieranzahl η der Kontrollgruppen sind willkürlich gleich 100 gesetzt. Die Mittelwerte der cystaminbehandelten Tiere sind auf die Kontrollgruppen bezogen. Den relativen Mittelwerten sind die relativen S. E. M.-Werte (S. E. M. = $SD/n^{0.5}$) zugeordnet.

Gruppe	n	Tage nach Cystamin	Leukozyten	Granulozyten	CL	normierte CL
Kontrolle	15	2	100 ± 6,3	100 ± 8,4	100 ± 9,0	100 ± 12,0
Cystamin	15	2	87,0 ± 5,7	89,9 ± 7,0	91,2 ± 7,1	100,4 ± 9,5
Kontrolle	16	4	100 ± 5,3	100 ± 8,2	100 ± 13,8	100 ± 8,2
Cystamin	14	4	85,9 ± 8,2	101,0 ± 14,6	91,6 ± 9,4	95,2 ± 12,2

CL auswirkt. Insgesamt ist der Einfluß der Cystamin-Behandlung auf die Blutwerte der unbestrahlten Tiere unseres Mäusestamms nur gering. Andererseits vermindert Cystamin, das man dem Blut in vitro beifügt, die CL-Ausbeute. Die CL-Werte betragen 16170 ± 1146 Impulse ohne Cystamin und $3\,900 \pm 1466$ Impulse, wenn man dem in Abb. III.2 dargestellten Ansatz 0,1 mg Cystamin zusetzte. Bei den genannten Ausbeuten handelt es sich um Mittelwerte von drei Blutproben mit Standardabweichungen, wobei immer gleiche Blutproben mit und ohne Cystamin-Zusatz verglichen wurden. Da die Photonen von Luminol eine Wellenlänge von ca. 460 nm besitzen und Cystamin erst unterhalb von 300 nm einen Absorptionsanstieg zeigt, dürfte die verminderte CL-Ausbeute

auf konkurrierende Reaktionen des Cystamins mit den Sauerstoffmetaboliten der zur Phagozytose-Aktivität stimulierten Granulozyten zurückzuführen sein.

In den Abbildungen III.21 sind die gemessenen Blutparameter für Tiere mit und ohne Cystamin-Behandlung nach Ganzkörperbestrahlung mit 2 (Abb. III.21a) und 4 Gray (Abb. III.21b) einander gegenübergestellt. Beim Vergleich des Einflusses von Cystamin auf die Granulozytenzahl ist zu beachten, daß es bei ungeschützten Tieren nach einer Strahleneinwirkung zu überschießenden Reaktionen kommt (s. auch Abbildungen III.11), die bei geschützten Tieren nicht zu beobachten sind. Das Cystamin wirkt sich eher regulierend auf die Granulopoese aus, wobei die Granulozytopenie 4 Tage nach der Bestrahlung mit 4 Gy nicht verhindert werden kann (Abb. III.21b). Dieses Verhalten entspricht auch den Beobachtungen anderer Autoren, wonach Mercaptoethylamin (Cysteamin) eher die Regeneration der Leukozyten beschleunigt (Bacq et al., 1953).

Eine Umkehrung des Ergebnisses der Granulozytenuntersuchung erhält man bei der CL. Hier wirkt sich die Gabe des Cystamins verstärkend auf die CL aus. Noch drastischer ist das Ergebnis der Cystamin-Gabe bei der normierten CL. Bei diesem Parameter liegt der Wert 4 Tage nach Bestrahlung mit 4 Gy sogar über der Kontrolle. Die CL und die normierte CL geben im Gegensatz zu den Granulozyten selbst eine „richtige“ Aussage über den Schutzeffekt des Cystamins.

Diskussion und Schlußfolgerung

Tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß es möglich ist, eine Chemilumineszenz (CL) im verdünnten Vollblut durch Stimulation der Granulozyten zu messen. Es bedarf also keiner aufwendigen Präparation des Bluts. Die verwendete Blutmenge von 50 μ l läßt sich auch noch weiter verringern.

Nach Ganzkörperbestrahlung im Dosisbereich von 1 bis 8 Gray ergeben sich in Abhängigkeit von der Zeit nach der Bestrahlung oszillierende Werte für die Granulozytenzahlen mit zum Teil überschießenden Reaktionen. Die CL-Werte zeigen ebenfalls Oszillationen, die teilweise mit den Granulozytenwerten korrelieren, in einigen Fällen jedoch auch konträr verlaufen. Es wurde beobachtet, daß im Beobachtungszeitraum zwischen 1 Tag und 16 Tagen nach der Bestrahlung die CL-Werte immer unterhalb der Kontrollwerte für nichtbestrahlte Tiere bleiben. Dieser Befund ist von großer Bedeutung für die Verwendung der CL als Dosisindikator.

Abb. III.21a

 = Tiere ohne Cystamin
 = Tiere mit Cystamin

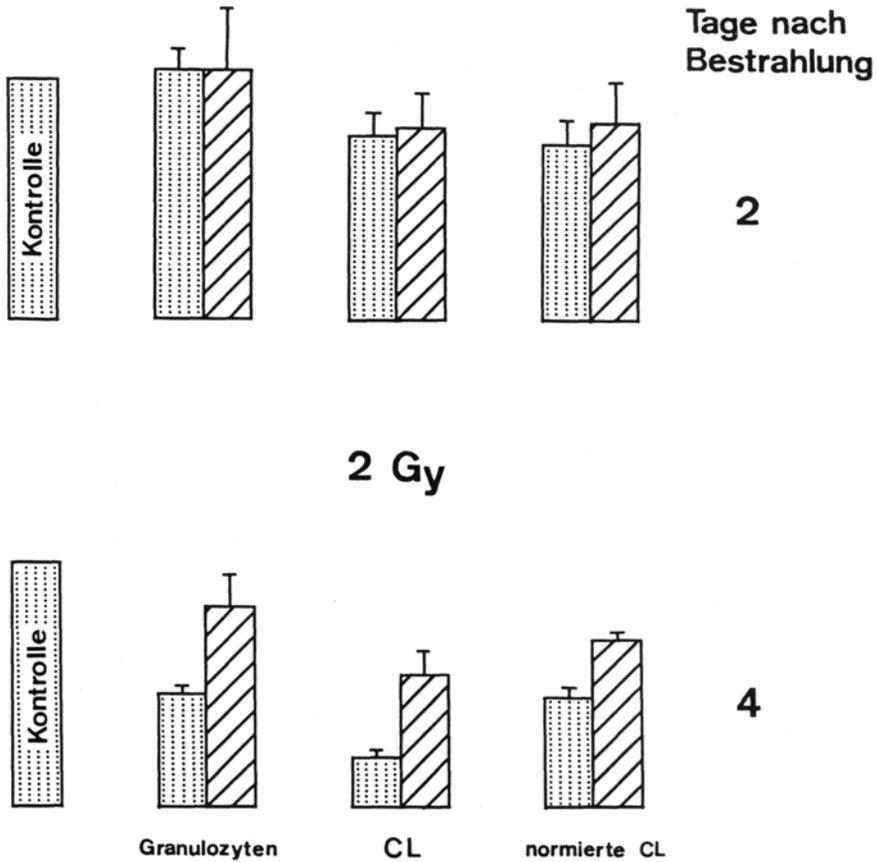


Abb. III.21 Einfluß von Cystamin auf die Werte der Granulozyten und der Chemilumineszenz (CL) nach Ganzkörperbestrahlung von Mäusen mit 2 Gray (a) und 4 Gray (b) bei einer Dosisleistung von 0,6 Gy/min. Die Säulen für die Kontrollen sind für die angegebenen Blutwerte willkürlich gleich hoch gesetzt. Die Markierungen auf den Säulen geben die Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) an. (s. auch Seite 175)

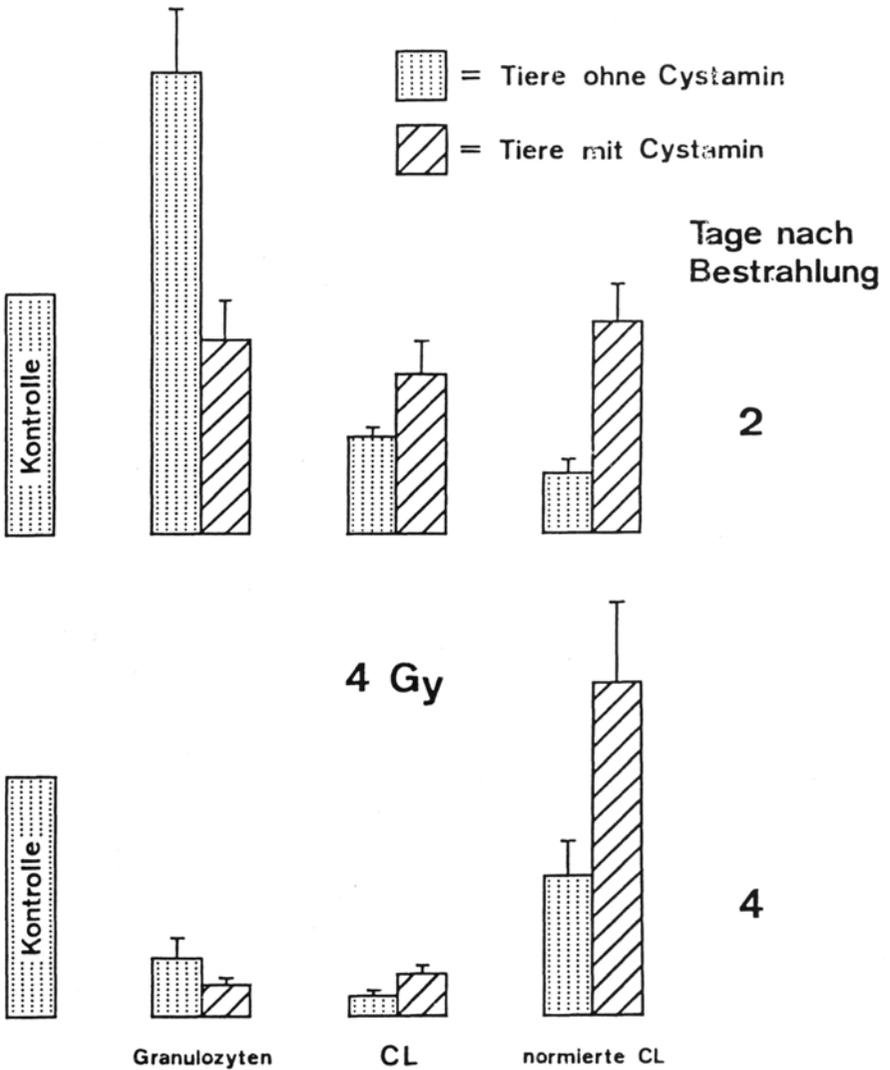


Abb. III.21b

Vier Tage nach der Bestrahlung werden die geringsten Werte für die Granulozytenzahl und für die CL beobachtet. Für diesen Zeitpunkt erhält man eine im wesentlichen exponentielle Abnahme der CL mit der Dosis, so daß man zwischen kleinen und hohen Dosen bei einer Ganzkörperbestrahlung unterscheiden kann.

Dosismodifizierende Faktoren, wie Teilkörperbestrahlung, Dosisleistung und Strahlenschutzstoffe, schlagen sich ebenfalls in den CL-Wer-

ten nieder, nicht dagegen in den Granulozytenzahlen. Dabei hat sich gezeigt, daß die CL bei der Teilkörperbestrahlung bis zu einer Dosis von 4 Gy in einem richtigen Verhältnis zum Anteil am bestrahlten Knochenmark steht. Die Abschätzung des Zeitfaktors aus der CL bei verminderter Dosisleistung ergab ähnliche Werte, wie sie von anderen Autoren für die LD 50, bezogen auf das hämopoetische Strahlensyndrom, bei Mäusen gefunden wurden. Auch der Schutzeffekt, der durch Cystamin bei bestrahlten Mäusen zu erreichen ist, wurde durch höhere CL-Werte gegenüber den Werten bei ungeschützten Tieren richtig wiedergegeben.

Es stellt sich die Frage, inwieweit die hier ermittelten tierexperimentellen Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden können. Grundsätzlich kann die CL auch im Vollblut des Menschen gemessen werden (KATO et al., 1981). Die Lichtausbeute ist bei gleicher Blutmenge und bei Stimulierung mit Zymosan sogar mindestens doppelt so groß wie im Mäuseblut (Ladner und Mönig, 1984). Untersuchungen am Blut gesunder Erwachsener haben gezeigt, daß zwischen dem Maximum der CL-Intensität und der Granulozytenzahl eine proportionale Abhängigkeit besteht (Lindena et al., 1987). In der zitierten Arbeit von Lindena et al. sind weitere Faktoren, die Einfluß auf die CL haben, untersucht worden. Die Chemilumineszenz-Methode wird im klinischen Bereich eingesetzt, z.B. bei Krankheiten des Blutes und des Immunsystems (DeChatelet und Shirley, 1981; Fischer et al., 1982; Candido et al., 1983; Skacel und Chanarin, 1983), bei Infektionskrankheiten (Suematsu et al., 1987; Miyamata et al., 1988), bei Hautkrankheiten (Schöpf und Kapp, 1987), bei Verbrennungskrankheiten (Allen und Pruitt, 1982), bei chirurgischen Eingriffen (Schackert et al., 1984; Heberer et al., 1985), bei Transplantationen (Rush et al., 1986; Toivanen et al., 1987), bei Tumorpatienten (Braun et al., 1981; Braun et al., 1982; Cameron 1983; Müller et al., 1987) und bei der Duchenne Muskeldystrophie (Pernice et al., 1981). Unter diesem Aspekt ist die CL-Bestimmung nicht mehr als Außenseiter-Methode anzusehen. Betrachtet man die Durchführung der CL-Messung von der apparativen Seite, so ist festzustellen, daß heute routinemäßig Biolumineszenz-Messungen im Bereich der klinischen Mikrobiologie (z.B. Bakteriurie-Test) eingesetzt werden (Harber, 1984). Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um die Bestimmung des Adenosintriphosphats (ATP), die nach der Leuchtkäfer-Reaktion (firefly) erfolgt. Die Lichterzeugung wird bei dieser Reaktion mit Geräten für einen ATP-Assay gemessen. Es ist also möglich, an Kliniken CL-Messungen am Blut von Patienten durchzuführen. Es wird daher empfohlen, zusätzlich zu den hämatologischen Untersuchungen CL-Bestimmungen am verdünnten Vollblut durchzuführen. Das Ergebnis kann als weiterer Indikator für die Strahlenschädigung des Knochenmarks herangezogen werden.

Zusammenfassung

In tierexperimentellen Untersuchungen an Mäusen wurde der Einfluß von Röntgenbestrahlungen auf die Chemilumineszenz-Ausbeute (CL) von Granulozyten des peripheren Bluts gemessen. Die Messungen erfolgten im verdünnten Vollblut mit Luminol als chemiluminogener Substanz. Die Granulozyten wurden durch Zymosan aktiviert. Folgende Abhängigkeiten wurden untersucht: Dosis von 1 bis 8 Gy 12 Stunden bis 32 Tage nach Ganzkörperbestrahlung und Dosis von 1 bis 8 Gy zwei und vier Tage nach Teilkörperbestrahlung und Dosis von 1 bis 4 Gy einen Tag bis vier Tage nach Ganzkörperbestrahlung mit verminderter Dosisleistung (0,02 Gy/min anstelle von 0,6 Gy/min). Von einzelnen Werten abgesehen, sind die CL-Ausbeuten dosisabhängig gegenüber unbestrahlten Kontrollen erniedrigt. Bei unbestrahlten Tieren besteht eine enge Korrelation zwischen Granulozytenzahl und CL. Diese Korrelation vermindert sich nach Ganzkörperbestrahlung. Am 4. Tag nach einer Ganzkörperbestrahlung besteht eine exponentielle Dosisabhängigkeit der CL für beide verwendeten Dosisleistungen, wobei der Zeitfaktor zwischen den Dosisleistungen 0,02 und 0,6 Gy/min 1,34 beträgt. Dieser Wert entspricht in etwa dem aus Literaturangaben errechneten Zeitfaktor von 1,27 für die LD 50/30d. Die CL-Werte sind am 4. Tag nach einer Teilkörperbestrahlung mit 1, 2 und 4 Gy, bei der etwa 50 % des Knochenmarks bestrahlt wurden, gegenüber einer Ganzkörperbestrahlung nur um die Hälfte erniedrigt. Ferner wurde geprüft, wie sich die Schutzsubstanz Cystamin auf die CL auswirkt. Cystamin führt bei bestrahlten Tieren zu höheren CL-Werten als bei ungeschützten Tieren. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die CL-Methode die Bestrahlungsbedingungen am vierten Tag nach der Bestrahlung gut widerspiegelt.

Literatur

- Allen, R. C. (1982) Biochemiexcitation: Chemiluminescence and the study of biological oxygenation reactions. In: Chemical and biological generation of excited states (W. Adam, G. Cilento, Eds.) pp. 309-344. Academic Press, New York, 1982
- Allen, R. C, B. A. Pruitt (1982) Humoral-Phagocyte axis of immune defense in burn patients. Chemiluminigenic probing. Arch. Surg. 117: 133-140
- Allen, R. C., R. L. Stjernholm, R. H. Steel (1972) Evidence for the generation of an electronic excitation State in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bacterial activity. Biochem. Biophys. Res. Comm. 47: 679-684
- Bacq, Z. M., A. Herve, F. Scherber (1953) Action de la mercaptoethylamine sur la regeneration des leucocytes chez la souris apres Irradiation aux rayons x. Arch. int. pharmacodyn. 94: 93-102

- Bass, D. A., P. Olbrantz, P. Szejda, M. C. Seeds, C. E. McCaill (1986) Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. *J. Immunol.* 136: 860-866
- Berthold, F., H. Kubisiak, M. Ernst, H. Fischer (1981) Six-channelluminescence analyzer für phagocytosis applications. In: *Bioluminescence and Chemiluminescence. Basic Chemistry and Analytical Applications* (M. A. DeLuca, W. D. McElroy, Eds.), pp. 699-703. Academic Press, New York
- Braun, D. P., K. P. De Boer, J. E. Harris (1982) Chemiluminescence, suppression and cytotoxicity in peripheral blood mononuclear cells from solid tumor Cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 14: 86-91
- Braun, D. R., J. E. Harris, S. Maximovich, R. Marder, T. F., Lint (1981) Chemiluminescence in peripheral blood mononuclear cells of solid tumor Cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 12: 31-37
- Briganti, G., V. Covelli, G. Silini, P. N. Srivastava (1970) The distribution of erythropoietic bone marrow in the mouse. *Acta Haematol.* 44: 355-361
- Cameron, D. J. (1983) A comparison of the cytotoxic potential in polymorphonuclear leukocytes obtained from normal donors and Cancer patients. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 28: 115-124
- Candido, A., P. Rossi, F. Meo, S. Lippa, G. Littarru, R. De Sole (1983) A whole blood chemiluminescence study in some hematological patients, *Haematol.* 68: 478-486
- Casarett, A. R. (1968) *Radiation Biology*. p. 244 f. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey
- DeChatelet, L. R., P. S. Shirley (1981) Evaluation of chronic granulomatous disease by a chemiluminescence assay of microliter quantities of whole blood. *Clin. Chem* 27:1739-1741
- Eastham, R. D. (1968) *Klinische Hämatologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Fischer, H., H. Staudinger (1981) Chemilumineszenz, ein Indikator für Zellaktivierung? *Klin. Wochenschr.* 59: 199-201
- Fischer, H., M. Ernst, F. E. Maly, T. Kato, H. Wokalek, M. Heberer, D. Maas, B. Peskar, E. T. Rietschel, H. Staudinger (1982) Chemiluminescence assays in the diagnosis of immune and hematological diseases. In: *Luminescent Assays: Perspectives in Endocrinology and Clinical Chemistry* (M. Serio, M. Pazzaglio, Eds.). pp. 229-241. Raven Press, New York
- Fischer, H., I. Hovestadt, H. Mönig (1982) Chemilumineszenz von Blutleukozyten röntgenbestrahlter Mäuse im subletalen Dosisbereich. *Jahrestagung der Schutzkommission beim BMI*. S. 177-185
- Fliedner, T. M. (1973) Pathophysiologie der Strahlenempfindlichkeit des Knochenmarks. *Strahlenschutz in Forschung und Praxis* 13: 38-48
- Fricke, H., E. J. Hart (1966) Chemical dosimetry. In: *Attix, F. H., W. C. Roesch (eds.): Radiation Dosimetry, Vol. II*. pp. 167-239. Academic Press, New York
- Harber, M. J. (1984) Applications of luminescence in clinical microbiology. In: *Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence* (L. J. Kricka, R. E. Stanley, G. H. G. Thorpe, T. R. Whitehead, Eds.). pp. 3-15. Academic Press, London, Orlando

- Heberer, M., A. M. Zbinden, M. Ernst, M. Dürig, F. Härder (1985) The effect of surgery and anesthetic agents on granulocyte-chemiluminescence in whole blood. *Experientia* 41: 342-346
- Hovestadt, I., M. Ernst, H. Mönig, H. Fischer (1983) The early effect of sublethal x-irradiation of phagocytic cells in mouse blood and the influence of cystamine as measured by chemiluminescence. *Int. J. Radiat. Biol.* 44: 563-573
- Kato, T., H. Wokalek, E. Schöpf, H. Eggert, M. Ernst, E. T. Rietschel, H. Fischer (1981) Measurement of chemiluminescence in freshly drawn human blood. I. Role of granulocytes, platelets, and plasma factors in zymosan-induced chemiluminescence. *Klin. Wochenschr.* 59: 203-211
- Koch, R., I. Seiter (1966) Einfluß einer Kopfbestrahlung auf den Radioeisenbau in Erythrozyten. *Strahlentherapie* 129: 608-615
- Ladner, H.-A., H. Mönig (1984) Chemilumineszenz-Messungen am Blut bestrahlter Patienten. (Bisher unveröffentlicht)
- Lindena, J., H. Burkhardt, A. Dwenger (1987) Mechanisms of non-opsonized zymosan-induced and luminol-enhanced chemiluminescence in whole blood and isolated phagocytes. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 25: 765-778
- Miyata, H., N. Moriguchi, T. Kinoshita (1988) The chemiluminescence response of polymorphonuclear leukocytes from febrile patients. *Clin. Chim. Acta* 173: 337-342
- Mönig, H., G. Konermann (1993) Effect of whole-body Irradiation on phagocytic cells in mouse blood measured by chemiluminescence. *Strahlenther. Onkol.* 169: 418-426
- Mönig, H., H. Sedlmeier, O. Messerschmidt (1986) The influence of the solvent on the toxicity and radioprotective effect of thiophosphate WR 2721 in mice. *Strahlenther. Onkol.* 162: 134-137
- Müller, S., J. Krasner, H. Ozer, L. Blumenson (1987) Modification of luminol-dependent chemiluminescence reactivity of peripheral blood leukocytes from patients with lymphoreticular tumor, solid Cancer, or healthy blood donors by interferon- α . *J. Interferon Res.* 7: 1-16
- Pernice, W., M. Ernst, W. Ax, W. Künzer (1981) A micromethod possibly apt for routine-measurement of chemoluminescence (CL) of polymorphonuclear leukocytes isolated in part from whole blood. Attempt of a clinical application. *Immunobiol.* 160: 82
- Rush, D. N., D. A. Niven, D. J. Taylor, J. R. Jeffery (1986) Increased hydrogen peroxide production by monocytes of renal transplant patients: Suppressive effects of H₂O₂ on lymphocyte proliferation. *Transplant. Proc.* 18: 221-223
- Schackert, H. K., M. Betzier, G. F. Zimmermann, H.-P Geisen, L. Edler, G. H. Geelhaar, C. Herfarth (1984) Perioperative zymosan induced chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes in surgical Cancer patients. In: *Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence* (L. J. Kricka, R.E. Stanley, G. H. G. Thorpe, T. P. Whitehead, Eds.). pp. 351-355. Academic Press, London, Orlando
- Schöpf, E., A. Kapp (1987) Chemiluminescence response of polymorphonuclear leukocytes in atopic dermatitis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 82: 380-382
- Skacel, P. O., I. Chanarin (1983) Impaired chemiluminescence and bactericidal killing by neutrophils from patients with severe cobalamin deficiency. *Brit. J. Haematol.* 55: 203-215

- Smith, W. W., J. Cornfield, C. Luskus, C. Miller (1965) β -Mercaptoethylamine effect on radiation dose-response characteristics of granulocyte and lymphocyte counts. *Radiat. Res.* 26: 146-158
- Suematsu, M., M. Suzuki, T. Kitahora, S. Miura, K. Suzuki, T. Hibi, M. Watanabe, H. Nagata, H. Asakura, M. Tsuchiya (1987) Increased respiratory burst of leukocytes in inflammatory bowel diseases. The analysis of free radical generation by using chemiluminescence probe. *J. Clin. Labor. Immunol.* 24: 125-128
- Suzuki, H., M. J. Pabst, R. B. Johnston (1985) Enhancement by Ca^{2+} or Mg^{2+} of catalytic activity of the superoxide-producing NADPH oxidase in membrane fractions of human neutrophils and monocytes. *J. Biol. Chem.* 260: 3635-3639
- Toivanen, A., J. Nikoskelainen, E.-M. Lilius, T.T. Salmi, K. Kätkä, T.-T. Pelliniemi, A.-L. Mäki, A. Rajamäki (1987) Peripheral blood chemiluminescence as an early indicator of successful bone marrow transplantation. *Transplant. Proc.* 19: 2745-2746

Die Autoren

Mönig, Hans

Professor Dr. rer nat.

ehemals Institut für Biophysik und Strahlenbiologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Albertstraße 23

79104 Freiburg

Konermann, Gerhard

Professor Dr. rer nat.

Arbeitsgruppe Strahlenbiologie im Institut für Biophysik und Strahlenbiologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Albertstraße 23

79104 Freiburg

Danksagung

Frau Bettina Mayer gilt unser Dank für die Mithilfe bei der Durchführung von Versuchen und für die Anfertigung der Abbildungen. Ferner haben wir Herrn Dr. F.-E. Maly, früher MPI für Immunbiologie, Freiburg, für wertvolle Hinweise zur experimentellen Durchführung der Versuche zu danken.

IV Zellmembranänderungen als biologische Dosisindikatoren

Strahleninduzierte Membranänderung im subletalen Dosisbereich

Immunbindungsreaktionen an Lymphozyten

*Paul Bidon, Gerhard Doll, Burghard Fehre,
Ernst Ludwig Sattler, Georg Seibold, Bruno Vogt*

Einleitung

Die biologische Strahlendosiserkennung läßt sich vereinfachend in zwei Gebiete unterteilen. Einmal geht es darum, mit Hilfe biologischer Objekte gewissermaßen eine Ortsdosis zu bestimmen. Dies wurde schon von GLOCKER et al. (1949) an Hand der Verwendung von Drosophila-embryonen demonstriert. Zweitens wird versucht, am selben biologischen Objekt möglichst frühzeitig Strahlenreaktionen zu erkennen, die als Indikator oder Maß für einen letztlichen, späteren Schädigungsgrad gelten können (FLIEDNER u. STODTMEISTER, 1962; BOND et al., 1965). Die Hauterythemdosis war wohl der klassische Vorläufer für die biologische Strahlendosimetrie mit der Beobachtung von Strahlenreaktionen am betroffenen Objekt.

Die Bestimmung der Chromosomenaberrationen in Leukozyten ist auch ein sehr empfindliches Verfahren ($< 0,01$ Gy sind feststellbar), das in letzter Zeit zufriedenstellend vervollkommenet worden ist. Auch die weiteren, in diesem Band dargestellten Verfahren versprechen die Möglichkeit der praktischen Verwendung.

In der hier vorliegenden Untersuchung wurde ein besonderes Problem angegangen, das sich aus der Fragestellung ergibt, ob bereits bestrahlte Personen einer zweiten Bestrahlung ausgesetzt werden können, ohne damit in einen letalen Dosisbereich zu kommen. Dies erfordert eine möglichst prompte Erfassung der Erstbestrahlung. Im Gegensatz zur Bestimmung der Chromosomenaberrationen, die eines längeren Zeitintervalls (Tage) bedarf, sollte geprüft werden, wie die an Lymphozyten, die aus Lymphknoten von Mäusen isoliert worden waren, festgestellte dosisabhängige Reduktion der Bindung der gegen deren membranständige Immunglobuline gerichteten Antikörper (OJEDA et al., 1979) auf humane Lymphozyten übertragen werden kann. Diese frühe Reaktion,

die im Zeitraum von etwa 1 bis 6 Stunden keine Veränderung mehr erfährt, versprach mit fortschreitender Entwicklung der technischen Mittel eine sehr rechtzeitige biologische Dosiserkennung. Das Endziel sollte schrittweise erreicht werden. Zunächst mußten die Ergebnisse von OJEDA verifiziert werden, um dann auf Vollblut und darüber hinaus auf in vivo Bestrahlung übertragen werden zu können. Dann mußte am Menschen bzw. an anderen Tieren als Mäusen, die eine für diese Untersuchungen notwendige, geeignete mehrfache Blutentnahme gestatteten, gezeigt werden, daß die Antikörperbindung auch bei diesen Spezies strahlenabhängig verringert wird.

Material und Methoden

FITC-markiertes (Fluoreszeinisothiocyanat) Anti-IgG (Fab) oder Anti-IgM (Fab) wurde zur Membranbindungsreaktion eingesetzt. Im Fall der Untersuchungen mit Humanblut kam teilweise eine Doppelantikörpermethode zum Einsatz. Die Fluoreszenzmarkierung der Kaninchenlymphozyten geschah zum Teil mit Biotin-Streptavidin-Verstärkung. Die Inkubation mit dem Antikörper dauerte 15 Minuten bei 37° C. Anschließend wurden die Zellen der Maus in HBSS + BSA (Hanks balanced salt Solution und Rinderserumalbumin) oder die Zellen vom Menschen und Kaninchen PBS + BSA (Phosphatpufferlösung und Zusatz von Rinderserumalbumin) gewaschen und bis zur Beobachtung im Dunkeln entweder in Eiswasser (Mauszellen) oder bei Raumtemperatur (Human- und Kaninchenlymphozyten) aufbewahrt.

Die Fluoreszenzbeobachtung erfolgte mit einem Zeiß-Fluoreszenzmikroskop (Standardmodell), ausgerüstet mit einer HBO 200 W oder später XBO 100 W-Lampe. Als Erregerlichtfilter wurde ein BG 12 (Schott/Mainz) und als Sperrfilter OG 50 (Schott/Mainz) bei den Versuchen mit Mauslymphozyten verwendet. Für die Untersuchungen an Kaninchen- und Humanzellen wurde folgende Filterkombination eingesetzt: Erregerfilter BP 450-490, Sperrfilter LP 510. Die Beobachtung erfolgte mit Auflichtfluoreszenz unter Verwendung des Teilerspiegels FT 510. Es wurde ein Fluoritobjektiv Neofluar 40/0,75 (Ph2)-Objektiv bei einer Okularvergrößerung von 8 x benutzt nach Angaben von GERLACH (1985). Folgende Kriterien wurden als positive Zellmarkierung angesehen (SEILER et al., 1972; SEDLACEK, 1978):

1. Spots = wenige punktförmig fluoreszierende Stellen.
2. Patches = Zellen mit größeren fluoreszierenden Arealen.
3. Rings = Zellen, bei denen spots oder patches konfluieren und den Eindruck eines geschlossenen Ringes bewirken.

4. Caps = meist halbmondförmig an einem Zellpol aggregierte Fluoreszenz, deutlich abgesetzt von der restlichen unmarkierten Zelle.

Vitalitätskontrollen erfolgten über den Trypanblau-Ausschlußtest (Holmberg, 1961). Vergleichsweise wurde der Fluoreszenzfarbstoff „Hoechst“ 33 258 zur Vitalitätskontrolle getestet. Er brachte mit Trypanblau vergleichbare Ergebnisse (BIDON, 1982).

Die Auswertung erfolgte durch Zählung der Lymphozyten im Durchlicht und entsprechende Bestimmung durch Auflichtfluoreszenz im selben Bildfeld. Es wurden 200 bis 300 Zellen in fünf bis mehr als zehn Bildfeldern erfaßt (200 Mauslymphozyten in 5-10 Bildfeldern; 250-300 Human- bzw. Kaninchenlymphozyten in mehr als 10 Bildfeldern).

Die Zellaufbereitung geschah unterschiedlich, je nachdem ob Lymphozyten aus Lymphknoten oder Blut untersucht wurden. Im ersten Fall wurden die ca. 8-12 Wochen alten Tiere durch Genickbruch getötet und die Lymphknoten cervicalis superficialis, axillaris, brachialis sowie inguinalis entnommen. Um eine ausreichend hohe Zelldichte zu erhalten, wurde aus den Lymphknoten von vier Tieren je Versuch eine gemeinsame Zellsuspension hergestellt. Pro Versuch wurden je zwei männliche und zwei weibliche Tiere gleichen Alters verwendet. Die Lymphknoten wurden über ein feines Metallnetz in HBSS (Hanks balanced salt Solution), p_H 7,4, vorsichtig zerrieben. Die entstandene Suspension wurde mit einer Pasteurpipette gemischt, dreimal über Kunststoffgewebe unterschiedlicher Maschenweite (100-140 μm , 15-20 und 10-15 μm) gefiltert und anschließend fünf Minuten bei 330 g in 5 ml HBSS gewaschen. Das Zellsediment wurde aufgeschüttelt und zunächst in 2 ml HBSS resuspendiert. Die Zelldichte wurde dann auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Bis zur Bestrahlung wurden die Zellen in Eiswasser aufbewahrt.

Die Gewinnung der Lymphozyten aus Vollblut von Mäusen erfolgte durch Dichtegradienten-Zentrifugation mittels der Ficoll-Paque-Methode folgendermaßen:

1. Entnahmen von 1,5 ml Herzblut in heparinisierter (5 IU/ml) Spritze.
2. Verdünnen des Blutes 1:1 mit HBSS + BSA (1 %).
3. Vorsichtiges Überschichten einer Ficoll-Paque-Schicht (Ficoll 400 + Na-Diatrizoat, Dichte 1,077 +- 0,001 g/ml) mit dem verdünnten Blut.
4. Zentrifugieren mit 330 g, 20 Minuten, 18-20° C.
5. Abpipettieren des Lymphozytenrings.

6. Waschen der Lymphozyten in 5 ml HBSS + BSA und Zentrifugieren mit 330 g für 5 Minuten.
7. Zur Beseitigung einer unvermeidlichen Kontamination mit Erythrozyten erfolgt eine kurze Hämolyse (5 Min. bei 37° C in 10 mM Tris-Puffer p_H 7,4).
8. Zentrifugation und Resuspension in 2 ml HBSS + BSA.
9. Nach einem weiteren Waschgang einstellen einer Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml.
10. Aufbewahrung in Eiswasser zur Bestrahlung.

Die Aufbereitung mononukleärer Zellen aus Humanblut geschah je nach Versuchsansatz vor oder nach der Bestrahlung:

1. Das Blut wird zunächst mit PBS/BSA (Dulbecco's PBS, Ca-Mg-frei, Gibco; BSA, Standard Avidity, essentially fatty acid free, 30 % isotonic Solution, Serva) verdünnt und ein p_H von 7,25 eingestellt.
2. 5 ml Blut-Puffergemisch werden über 4 ml Ficoll-Paque (Dichte 1,077 g/ml) überschichtet und 20 Minuten bei 270 g und 17-20° C zentrifugiert.
3. Die Interphaseschicht, bestehend aus mononukleären Zellen und einer geringen Verunreinigung mit Erythrozyten, wird mit einer Pasteurpipette entnommen und nachfolgend zweimal mit PBS/BSA gewaschen (1. Waschung: 8 min, 270 g; 2. Waschung: 10 min, 110 g; jeweils Raumtemperatur). Hämolyse zwecks Beseitigung der restlichen Erythrozyten erwies sich bei Humanblut als überflüssig. Vorversuche zur magnetischen Abtrennung der Monozyten mit Eisenpartikeln führten zu erheblichen Zellverlusten und unterblieben dementsprechend gemäß einer Empfehlung der WHO/IACR 1974 (SCHUIT et al., 1986).

Die Isolation von Lymphozyten aus Kaninchenblut war gegenüber der aus Humanblut leicht verändert. Als Trennmedium wurde Lymphopaque verwandt (Dr. Molter GmbH; spez. Dichte 1,086 g/ml). Die starke Verunreinigung durch Erythrozyten wurde mittels Hämolyse mit Trisgepuffertem Ammoniumchlorid beseitigt (PERMS et al., 1970). Dazu wurden die pelletierten Zellen in Tris-NH₄Cl, p_H 7,2 resuspendiert und 2-3 Minuten stehen gelassen. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und, falls nötig, noch einmal derselben Prozedur unterzogen.

Für die Studien mit Mäuseblut wurden Tiere des Stammes HAN:NMRI (Zentralinstitut für Tierzucht, Hannover) verwendet. Das Kaninchenblut stammte von Tieren unterschiedlicher Provenienz.

Bestrahlt wurde im Ringschieber oder in der Klimakammer an einer ^{60}Co -Quelle mit einer Dosisleistung von 0,2-0,4 Gy/Min. bei Raumtemperatur. Ausnahmsweise wurde auch mit 40 MeV-Elektronen eines Linearbeschleunigers gearbeitet, um die hohe Dosisleistung der Einzelimpulse anzuwenden.

Ergebnisse

Im Prinzip konnten die von OJEDA et al. gefundenen Ergebnisse ebenfalls erzielt und damit bestätigt werden. Der zeitliche Verlauf der Immunbindungsreaktion ist völlig identisch mit einem Minimum der Bindungsfähigkeit zehn Minuten nach Bestrahlung, einer gewissen Erholung innerhalb weiterer 20 Minuten und einem dann längere Zeit unveränderlich bleibenden Wert einer reduzierten Bindung. Lediglich die von OJEDA et al. beschriebene hohe Strahlenempfindlichkeit schon in einem Bereich von 0,1 Gy ist verschoben in den Bereich um 1 Gy. Dieser Bereich ist allerdings auch für die mit dieser Dosimetrie zu erfassenden Dosen von größerem Interesse, wenn es notwendig wird, einerseits unter der Letalitätsschwelle mit Sicherheit zu verbleiben, andererseits aber auch deren Überschreiten durch einen zweiten Strahleninsult zu vermeiden, da Dosen unter 0,1 Gy für diese Fragestellung unerheblich sein sollten. In den Abbildungen IV.1 und IV.2 sind diese Ergebnisse vergleichend gegenübergestellt.

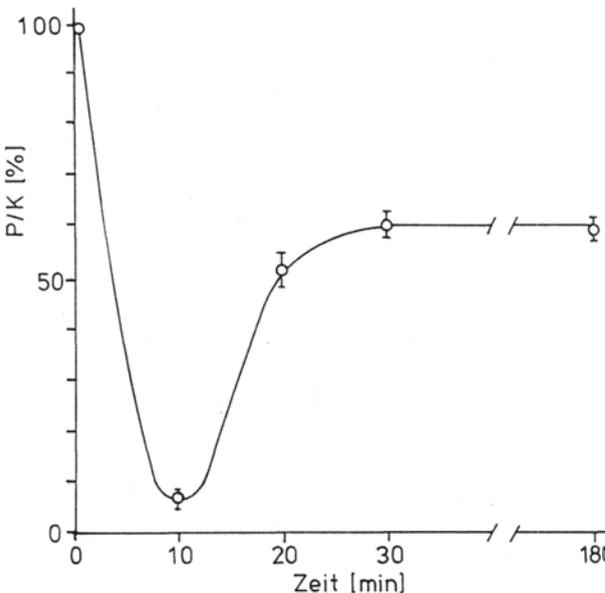


Abb. IV.1a u. b
a) zeitlicher Verlauf der Anti-IgG-Bindung an Mauslymphozyten aus Lymphknoten nach 9,6 cGy;
P = Probe
K = Kontrolle

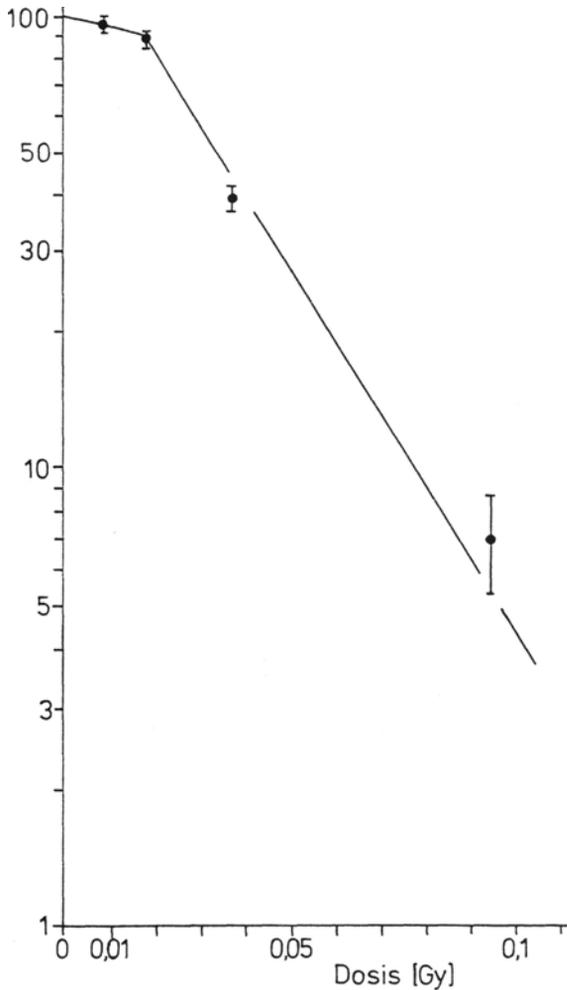


Abb. IV.1a u. b
 b) Dosiswirkungskurve
 30 Minuten nach Be-
 strahlung nach OJEDA
 et al. 1979. (Maximum
 der Wirkung = Mini-
 mum der Bindung. P/K
 = Probe/Kontrolle = %
 fluoreszierender Zellen
 der bestrahlten Probe
 bezogen auf % fluores-
 zierender Zellen der un-
 bestrahlten Kontrolle;
 fluoreszierende Zellen
 = Zellen mit positiver
 FITC-Anti-IgG-Bin-
 dung).

Nach in vivo-Bestrahlung ist selbstverständlich ein 10-Minutenwert nicht zu gewinnen, da die Isolation von Leukozyten aus Lymphknoten länger dauert. Die Strahlenempfindlichkeit ist aber offensichtlich in dem Zeitbereich > 60 Minuten nahezu identisch, so daß auch die Dosiswirkungskurve praktisch gleich verläuft, wie Abb. IV.3 zeigt.

Nach Isolation von Lymphozyten aus dem Blut von Mäusen wurde dieselbe in vitro-Strahlenreaktion hinsichtlich Dosisempfindlichkeit und zeitlichem Verlauf gefunden, wie sie die Zellen aus Lymphknoten zeigten. Der gleiche Anteil von Oberflächenimmunglobulin auf Lymphozyten aus Lymphknoten wie aus dem peripheren Blut gegenüber Milz- und Knochenmarklymphozyten (RABELLINO et al. 1971) läßt auch auf

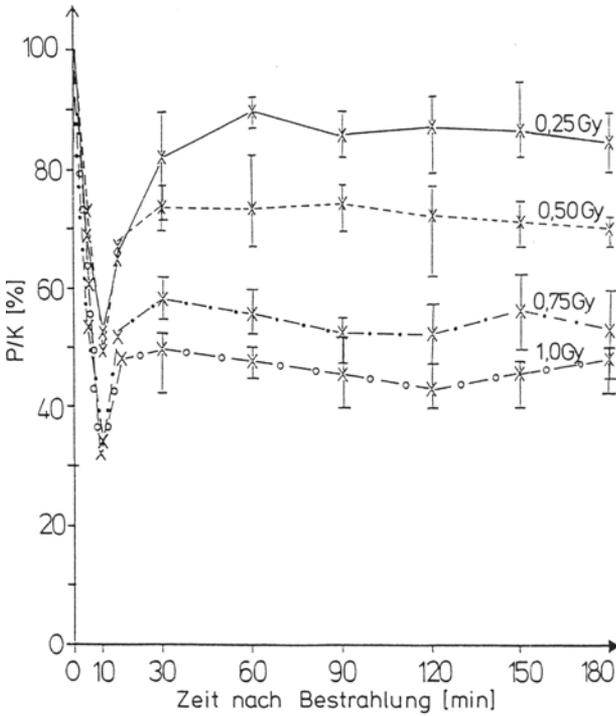


Abb. IV.2 Zeitlicher Verlauf der Anti-IgG-Bindung an Lymphozyten aus Mauslymphknoten nach in vitro-Bestrahlung; aufgetragen ist der Mittelwert aus jeweils fünf Versuchen sowie der Maximal- und der Minimalwert (P/K s. Abb. IV.1).

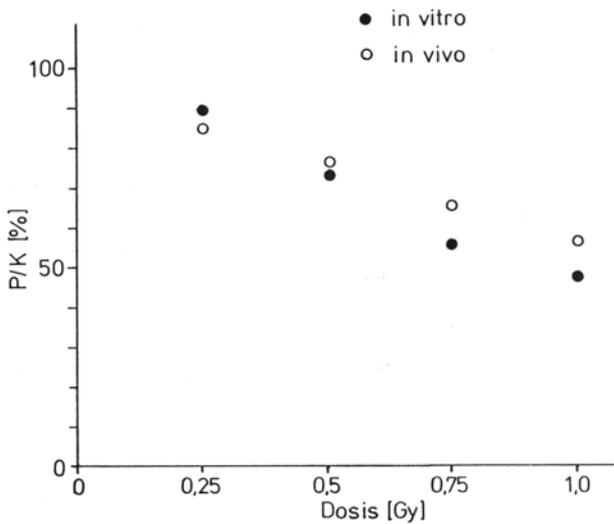


Abb. IV.3 Vergleich der Dosiswirkungskurven 60 Minuten nach in vitro- bzw. in vivo-Bestrahlung von Lymphozyten der Maus. Präparation aus Lymphknoten (1. Reaktionsplateau); (P/Ks. Abb. IV.1).

ein ähnliches Verhalten schließen. Abb. IV4 demonstriert den zeitlichen Verlauf nach Strahlendosen von 0,25 bis 1,50 Gy. Offensichtlich ist auch hier – wie in den vorherigen Experimenten – ein „Konstanzbereich“ von etwa 60 bis 300 Minuten zu finden.

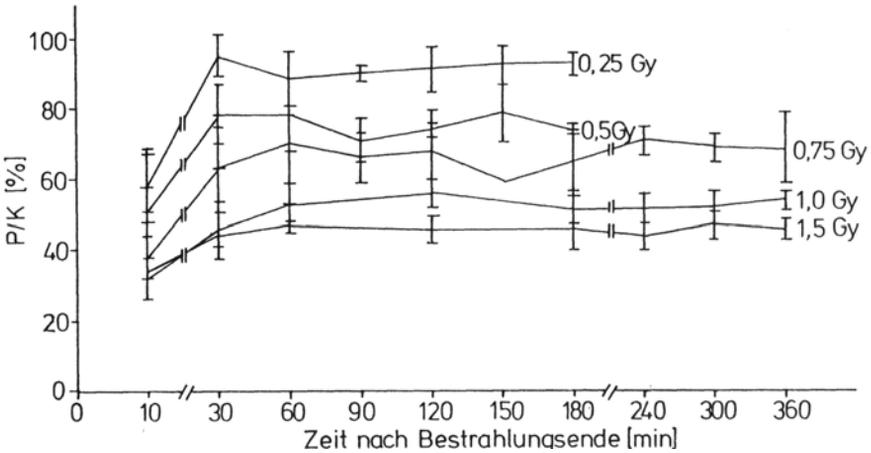


Abb. IV.4 Zeitlicher Verlauf der Anti-IgG- Bindung an aus Vollblut isolierten Lymphozyten der Maus nach verschiedenen Strahlendosen in vitro (P/K s. Abb. IV.1).

Für in vivo-Bestrahlungen wurde nun die Reaktionskonstanz in diesem Bereich ausgenutzt. Drei Stunden nach Bestrahlung wurden die Zellen zur Immunbindungsreaktion angesetzt. Dazu mußte allerdings ca. eine Stunde vorher das Blut den Tieren entnommen werden. Die gefundene Dosis-Effekt-Kurve ist in Abb. IV.5 wiedergegeben. Im wesentlichen wird die gleiche Strahlenempfindlichkeit gefunden wie nach extrakorporaler Bestrahlung.

Die in vivo-Strahlenapplikation ermöglichte es nun auch, den Untersuchungszeitraum länger auszudehnen, ohne daß die extrakorporale Haltung der Proben als zusätzlicher Einflußfaktor berücksichtigt werden mußte. Abb. IV.6 macht deutlich, daß nach 6 Stunden ein 1. „Konstanzbereich“ aufhört, die Immunbindungsreaktion wieder zunimmt und abermals von etwa zehn Stunden bis 24 Stunden unverändert bleibt (2. „Konstanzbereich“).

Ausgehend von der Tatsache der Existenz dieser Konstanzbereiche war es von Interesse festzustellen, ob eine fraktionierte Bestrahlung geringere Wirkung zeigt als eine einmalige Dosis. Dazu wurden Lymphozyten aus Lymphknoten im Abstand von einer Stunde mit zwei gleich großen Dosen bestrahlt und die Wirkung mit einmaliger Strahlung verglichen. Abbildung IV.7 gibt das Resultat wieder. Die Dosisfraktionie-

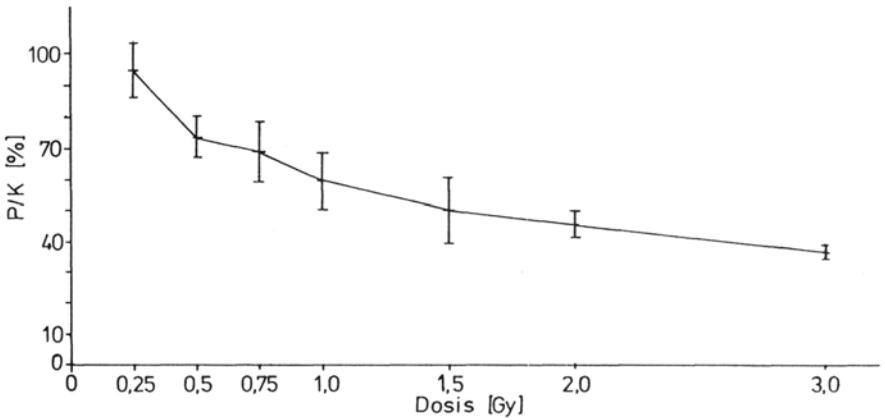


Abb. IV.5 Dosis-Wirkungskurve für die Anti-IgG-Bindung an Mauslymphozyten 3 Stunden nach in vivo-Bestrahlung. Der Mittelwert der Bindung der unbestrahlten Kontrolle betrug bei 46 Proben 25 % \pm 2,74 (SD) (P/K s. Abb. IV.1).

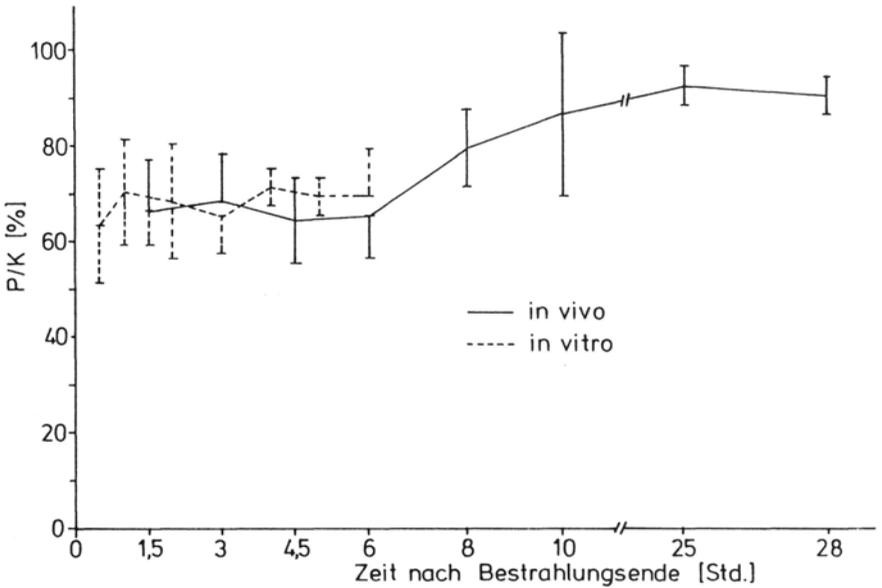


Abb. IV.6 Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Anti-IgG-Bindung an Lymphozyten nach Bestrahlung in vitro oder in vivo mit 0,75 Gy (P/K s. Abb. IV.1).

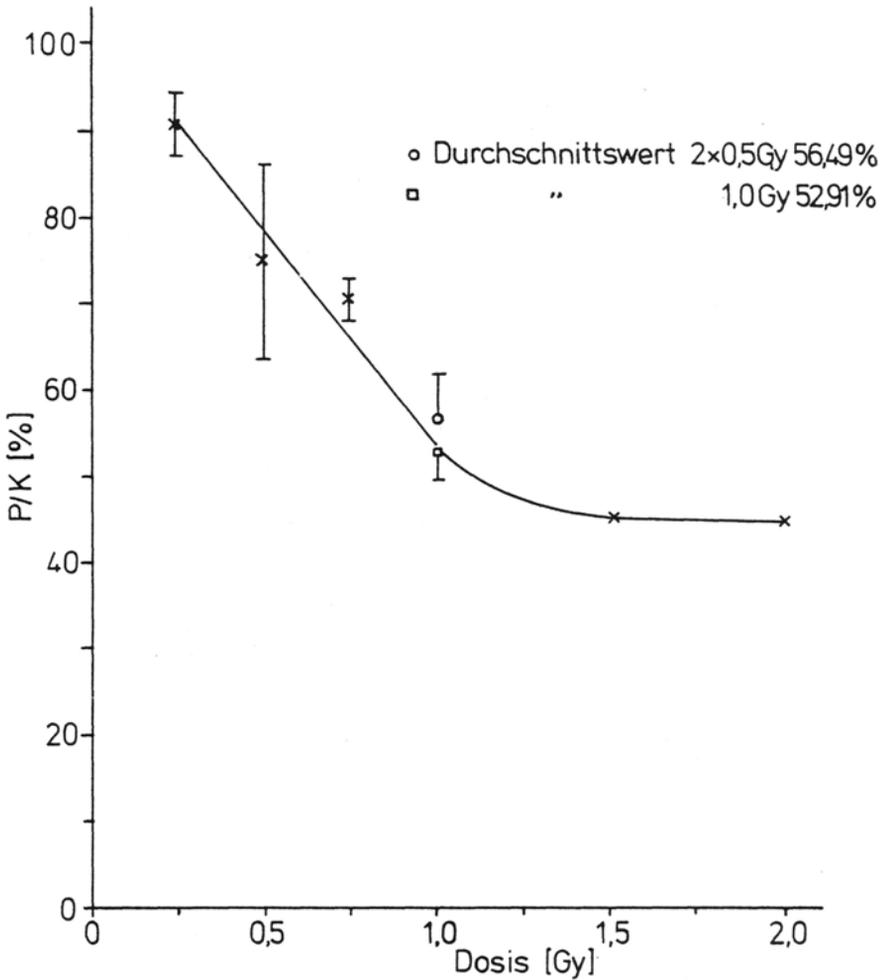


Abb. IV.7 Vergleich der Wirkung einer Dosisfraktionierung (2mal 50 cGy im Abstand von einer Stunde) mit einmaliger Bestrahlung, Auswertung 60 min. nach Bestrahlungs-ende (Lymphozyten aus Vollblut isoliert; (P/K s. Abb. IV.1).

ung führt offenbar nicht zu einer verminderten Wirkung. Dies bietet die Möglichkeit einer individuellen Dosiserfassung, worauf in der Diskussion noch einmal hingewiesen wird.

Mit einem Linearbeschleuniger werden die hier applizierten Dosen in etwa 2 Mikrosekunden verabfolgt. Eine stärkere Wirkung wird deutlich, wie Abb. IV.8 erkennen läßt.

Kaninchenlymphozyten wiesen keinen Strahleneffekt im Dosisbereich 0,1 bis 5 Gy hinsichtlich der hier untersuchten Immunbindungsreaktion

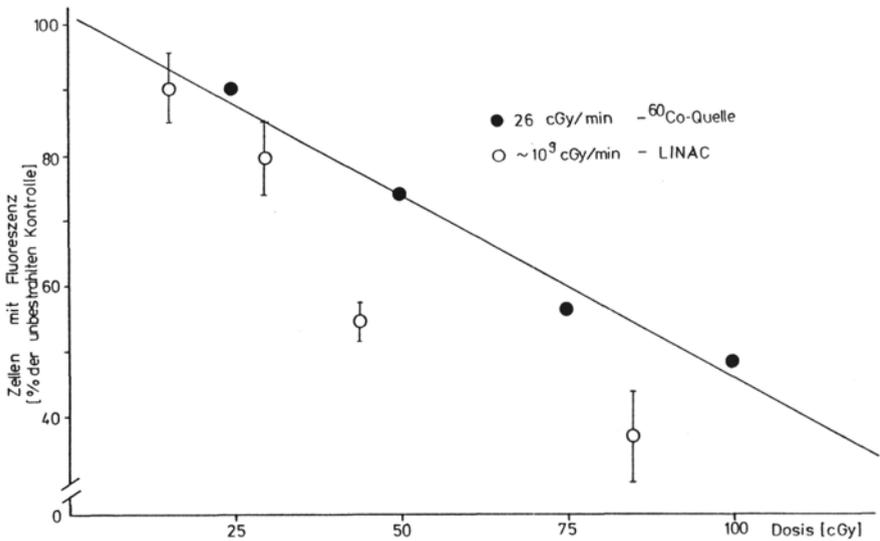


Abb. IV.8 Vergleich der Wirkung ultrahoher Dosisleistung eines Linearbeschleunigers (40 MeV Elektronen mit 0,15–0,5 Gy pro 2 μsec -Puls) mit ^{60}Co -Gammastrahlung (0,25–0,5 Gy pro Min.); in vitro-Bestrahlung (P/K s. Abb. IV.1).

auf. Dieser Befund wurde sowohl nach Bestrahlung in Suspension wie auch im Vollblut erhoben. Die Abbildungen VI.9 und IV.10 bringen die entsprechenden „Dosiseffektcurven“, die entweder 2 Stunden oder 4 bis 5 Stunden nach Bestrahlung erhalten wurden.

Erste Versuche an Humanlymphozyten hatten eine klare Verminderung der Bindungsreaktion von Anti IgG gezeigt. In Tabelle IV.1 sind Werte nach in vitro Bestrahlung mit 0,75 Gy zusammengestellt und zum Vergleich Daten der entsprechenden Versuche mit Mauslymphozyten. Diese Ergebnisse ließen sich jedoch nicht reproduzieren. Der zeitliche Verlauf nach 1,0 Gy und Bestrahlung in Suspension ist in Abb. IV.11 zu sehen. Anders waren die Ergebnisse wenn, statt wie bisher Anti-IgG, Anti-IgM verwendet wurde. Wie die Abbildung IV.12 erkennen läßt, gibt es von 0,2 bis 1,0 Gy einen zunehmenden Strahleneffekt. Dieser hat allerdings eine beträchtliche Schwankungsbreite und ist nach Bestrahlung in Vollblut nicht mehr nachzuweisen (Abb. IV.13).

Diskussion

Mit diesen Untersuchungen sollte die biologische Früherkennung einer Strahlendosis in einem Bereich von ca. 0,25 bis 2 Gy überprüft werden, um eine Entscheidung treffen zu können, wie gefährlich eine etwa not-

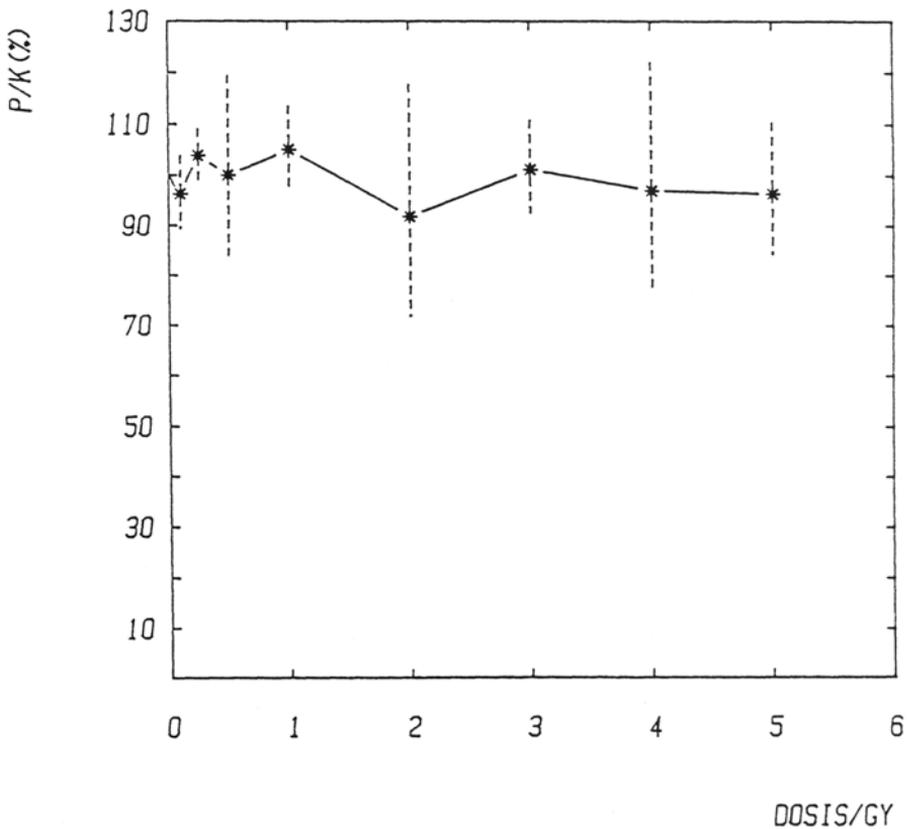


Abb. IV.9 Dosis-effekt kurve von Kaninchenlymphozyten 2 Stunden nach Bestrahlung in Suspension (anti-Kaninchen-sm-IgG-Bindung, Doppelmarkierungsverfahren: 1. Biotin-F(ab)₂-goat-anti-rabbit-IgG, 2. FITC-Streptavidin; (P/K s. Abb. IV.1).

wendig werdende zweite Strahlenexposition sein könnte. Aus diesem Grund muß die Strahlendosisermittlung ziemlich unmittelbar nach dem Strahleninsult erfolgen. Die meisten bisher in diesem Dosisbereich bekannten Reaktionen sind entweder zu zeitaufwendig oder geben erst zu einem späteren Zeitpunkt die gewünschte Auskunft. Mit dieser Arbeit wurde an Untersuchungen von OJEDA et al. (1979) angeschlossen, der mit Lymphozyten aus Lymphknoten der Maus experimentierte. Wie bereits eingangs erwähnt, wurde von den Autoren die Antikörperbindung an die weißen Blutkörperchen getestet. Dies bedeutet die Untersuchung eines zellwandständigen Parameters. Auch von KÖTELES et al. (G. J. KÖTELES, et al. 1976; T. KUBASOVA et al. 1981; T. KUBASOVA et al. 1982; J. KÖTELES et al. 1983; Z. SOMOSY et al. 1986) wurden mit verschiedenen Verfahren erfaßte Membranänderungen an verschiedenen Blutzellen in dem hier interessierenden Dosis- und Zeit-

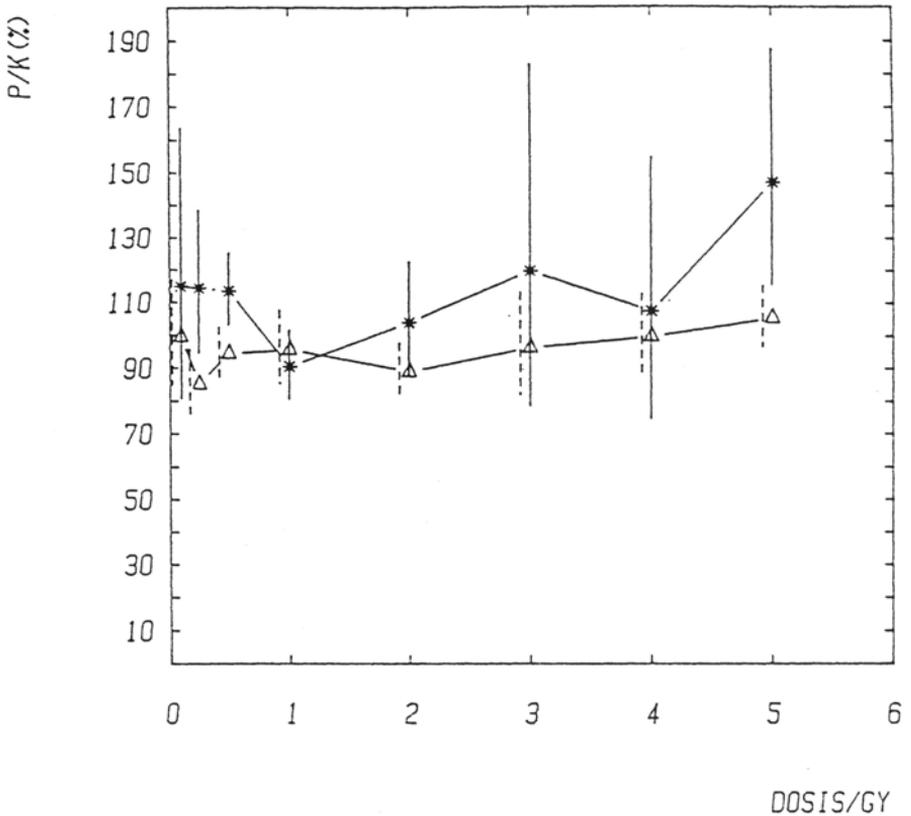


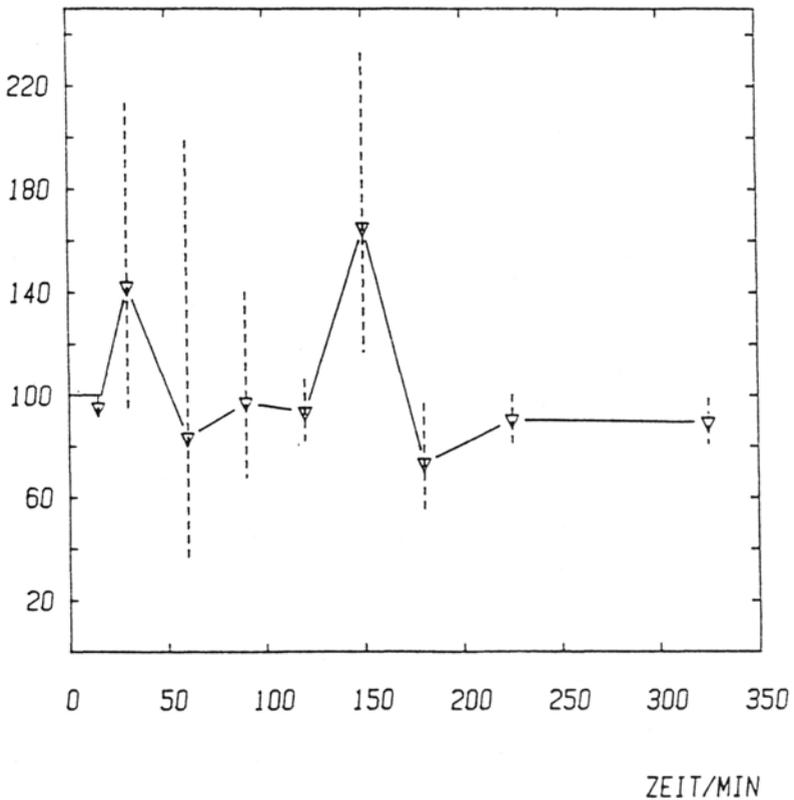
Abb. IV.10 Dosiseffektcurve von Kaninchenlymphozyten 4–5 Stunden nach Bestrahlung im Vollblut (anti-Kaninchen-sm-IgG-Bindung, F(ab)₂-Fragment; goat-anti-rabbit, * = FITC-markiert oder ^ = Doppelmarkierung wie Abb. IV.9 (P/K s. Abb. IV.1).

bereich beobachtet. SATO et al. (1977) beschreiben die Beeinträchtigung der elektrophoretischen Mobilität von Erythrozyten, die auch einen ähnlichen zeitlichen Verlauf hat wie in unseren Versuchen. Auch nach Bestrahlung mit dicht ionisierenden Strahlen wird der gleiche Effekt gefunden (VRANSKA et al. 1981—). Morphologische und biochemische Veränderungen an Lymphozyten werden von ANDERSON et al. (1977) schon 2 Stunden nach Bestrahlung mit 50 R (ca. 0,5 Gy) genannt. Von OHYAMA (1983) und YAMADA (1980) werden rasterelektronenoptisch Veränderungen schon 4 Stunden nach 400 R erkannt. Mit dem Durchstrahlungselektronenmikroskop sehen CHANDRA und STEFANI (1981) bereits 15 Minuten nach Bestrahlung von Lymphozyten Vorstülpungen und Löcher in der äußeren Zellmembran. Auch wir konnten an vereinzelt Zellen Löcher in der Lymphozytenoberfläche nach 5 bis 10 Gy beobachten (Abb. IV.14).

Tabelle IV. 1 Bindung von FITC-markiertem Anti-IgG an Humanblutlymphozyten verschiedener Spender (0,75 Gy, 0,25 cGy/min., Kobaltquelle)

Anteil fluoreszierender Zellen		
Kontrolle %	bestrahlt % d. Kontr.	Qualität
15,94	32,63	+
14,88	36,15	+
7,78	48,33	+ -
17,58	43,46	++
<u>15,21</u>	<u>56,48</u>	++
∅ 14,28	43,41	
+ - 3,78	+ - 9,54	

24,43	68,0	Mauslym-
+ - 2,74	+ - 10,48	phozyten



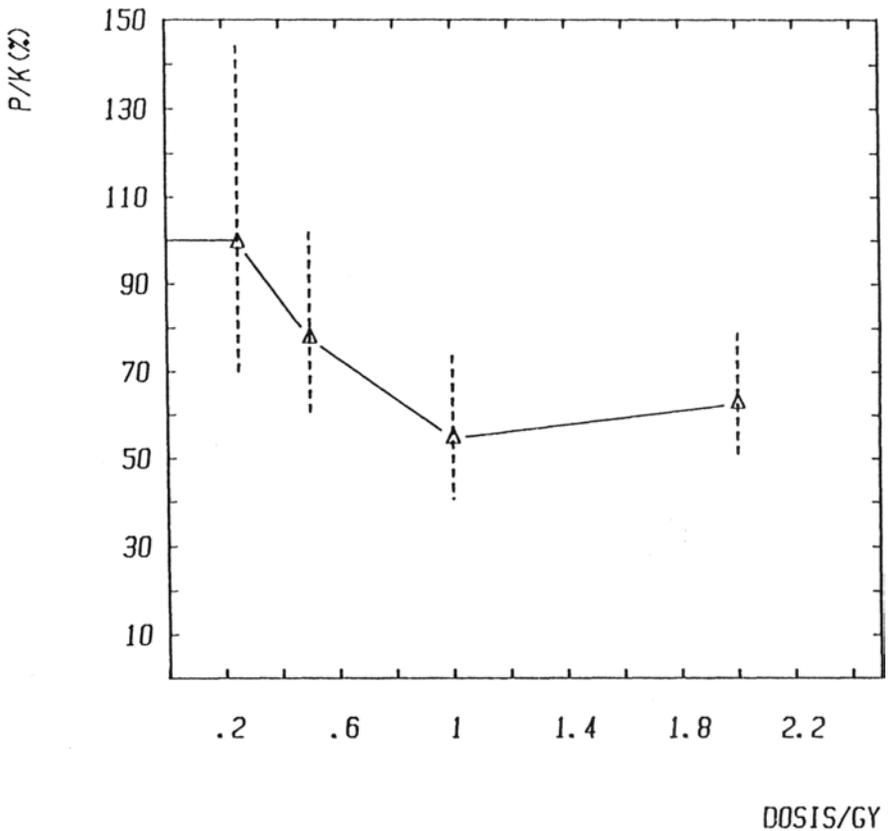


Abb. IV.12 Dosiswirkungskurve der anti-IgM-Bindung 2 Stunden nach Bestrahlung von Humanlymphozyten in Suspension; Doppelantikörpermethode, 1. Antikörper: Anti-Human-IgM/ μ -Kette/IgG/F(ab)₂-Fragment-Fluorescein-konjugiert vom Kaninchen (Behringwerke, Marburg), 2. AK: Anti-Kaninchen- γ -Globulin-IgG/F(ab)₂-Fragment-FITC-konjugiert von der Ziege (Behringwerke, Marburg) (P/K s. Abb. IV.1).

Blutzellen von Säugetieren und Mensch erfahren offensichtlich rasch nach Bestrahlung Veränderungen, die sich in membranständigen Eigenschaften bemerkbar machen. Unsere Untersuchungen geben letztlich keinen schlüssigen Hinweis darauf, ob der Strahlenangriff auch auf indirekte Effekte zurückzuführen ist. Gemeint ist hier der Angriff von Reaktionsprodukten aus dem Milieu der Zellen. Die Untersuchungen mit Mäuselymphozyten scheinen das auszuschließen, wenn auch leichte

Abb. IV.11 Zeitlicher Verlauf der anti-IgG-Bindung von Humanlymphozyten nach Bestrahlung in Suspension mit 1 Gy (P/K s. Abb. IV.1).

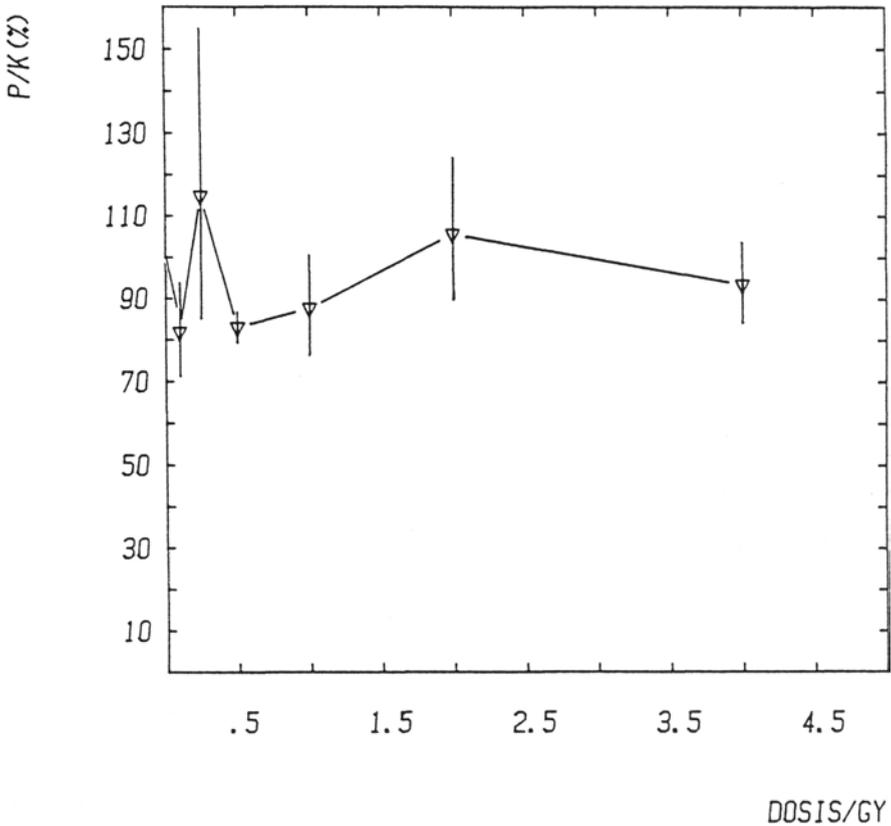


Abb. IV.13 Dosiswirkungskurve der anti-IgM-Bindung 4 Stunden nach Bestrahlung von Humanlymphozyten im Vollblut; Doppelantikörpermethode, s. Abb. IV.12 (P/K s. Abb. IV.1).

Unterschiede in der Dosiseffektkurve zwischen in vitro- und in vivo-Bestrahlung gefunden wurden. Wenn in unseren bisherigen Untersuchungen Humanlymphozyten nur in Suspension und nicht in Vollblut mit einer Erniedrigung der Antikörperbindung auf Bestrahlung reagierten, kann möglicherweise auf einen Strahlenschutzeffekt des Plasmas geschlossen werden. Demgegenüber weisen aber VIRSIK et al. (1980) darauf hin, daß in ihren Untersuchungen zum Interphasotod von Lymphozyten Strahlenschutzsubstanzen und Ionisationsdichte ohne Einfluß sind und daher eher Membranphänomene denn DNA-Schädigung die Absterbeursache sind. Die von ihnen bestimmte D_0 zum Absterbetest nach der Trypanblauausschlußmethode liegt in dem von uns untersuchten Dosisbereich je nach Untersuchungszeitpunkt. Auf jeden Fall deutet die Unwirksamkeit von Strahlenschutzsubstanzen auf einen direkten Effekt hin.

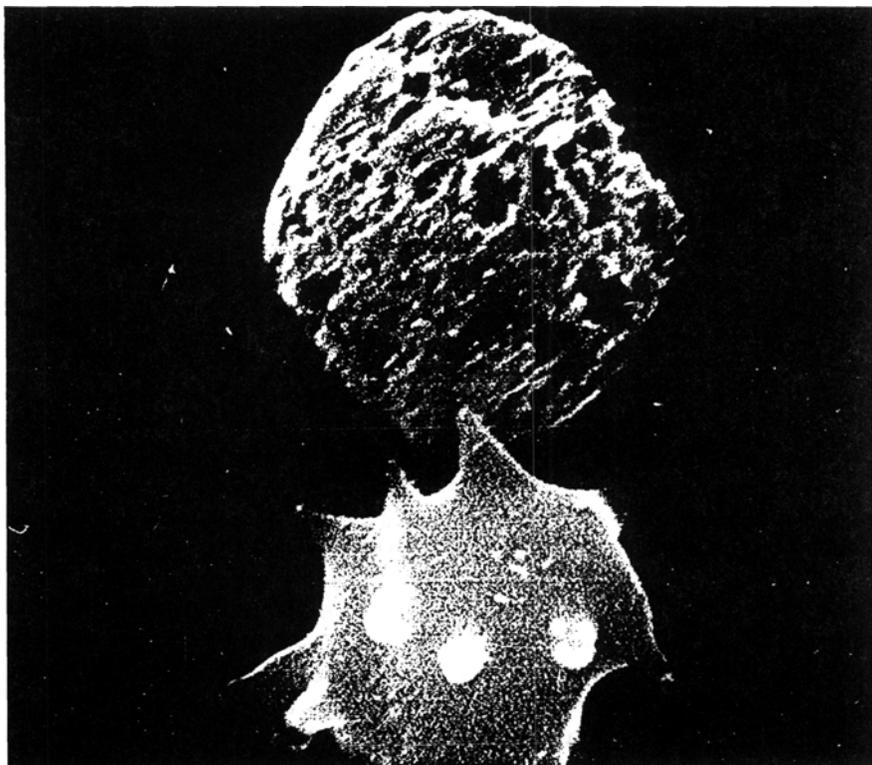


Abb. IV. 14 Lymphozyt mit Löchern in der Membran (5-10 Gy; vereinzelt Vorkommen, Ca. 1 %; rasterelektronenmikroskopische Aufnahme).

Unsere Untersuchungen mit Zweischlagbestrahlung lassen nicht auf eine Erholung schließen, wie auch von VIRSIK et al. (1988) beschrieben wurde. Damit ergibt sich aber die Chance einer individuellen Dosimetrie durch Nachbestrahlung *in vitro*. Außerdem läßt sich dadurch möglicherweise ein Teil der Individualität hinsichtlich der kritischen späteren Folgen (hauptsächlich hämatopoetisches Syndrom) ausschalten. Daß selbst in dem genetisch und haltungsmäßig ziemlich einheitlichen Tiermaterial individuelle Schwankungen zu erwarten sind, geht aus Abb. IV.15 hervor. Diese zeigt, daß der von uns sogenannte 1. Konstanzbereich der Immunbindungsreaktionsänderung zwischen 1 bis 6 Stunden nach Bestrahlung bei 3 bis 5 Stunden die geringste Streuung hat.

Wenn unsere Untersuchungen, an humanem Vollblut mit der Antikörperbindung Membranänderungen zu erfassen, nicht zum Erfolg geführt haben, ändert das nichts an der Tatsache, daß Membranänderungen

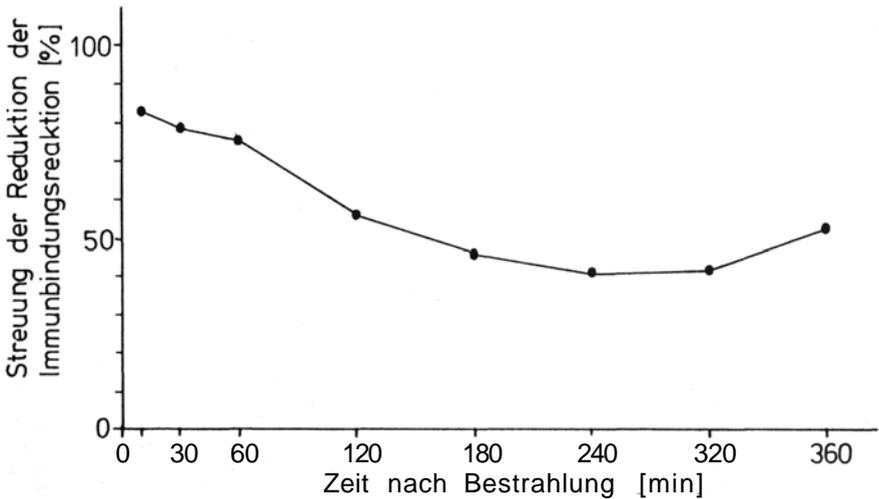


Abb. IY.15 Änderung der Streubreite der Reduktion der Immunbindungsreaktion im Zeitraum bis 6 Stunden nach Bestrahlung (Mauslymphozyten).

sehr schnell nach Bestrahlung im subletalen Ganzkörperdosisbereich auftreten. So haben FACCHINI et al. (1976) auch in dem Strahlendosisbereich bis etwa 1,0 Gy eine Beeinträchtigung des capping-Phänomens gefunden, die auch mit beträchtlich höherer Dosis dann nicht mehr gesteigert werden konnte. Es erscheint daher nur eine Frage des Geschicks der Nachweistechnik zu sein, ein biologisches Dosimeter anhand von Membranveränderungen verfügbar zu machen. Biologische Individualdosimetrie durch Erfassung früher Strahlenreaktionen hat gegenüber physikalischer, externer Dosimetrie den Vorteil, daß die immer eine Strahlenreaktion beeinflussende physiologisch-biochemische Ausgangssituation mindestens bis zu einem gewissen Grad Berücksichtigung findet und somit einen Teil der biologischen Variabilität eliminiert.

Literatur

- Anderson, R. E., J. Standefer u. V. Scaletti: Radiosensitivity of defined populations of lymphocytes; *Cellular Immunology* 33,45-61 (1977)
- Bidon, R: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur strahleninduzierten Veränderung des Bindungsvermögens der Lymphozytenmembran für Immunglobulin bei der Maus; Dissertation, Gießen (1982)
- Bond, V.R., T. M. Fliedner u. J. O. Archambeau: *Mammalian Radiation Lethality*; Academic Press, New York, London. 1965
- Chandra, S. u. S. Stefani: Plasma membrane as a sensitive target in radiation-induced cell injury and death; an ultrastructural study; *Int. J. Radiat. Biol.* 40, 305-311 (1981)

- Facchini, A., M. Maraldi, S. Bartoli, A. Farulla u. F. A. Manzoli: Changes in Membrane Receptors of B and T Human Lymphocytes Exposed to ^{60}Co Gamma Rays; Radiation Research 68,339-348 (1976)
- Fliedner, T. M. u. R. Stodtmeister: Experimentelle und klinische Strahlenhämatologie; J. F. Lehmanns Verlag, München 1962
- Gerlach, D.: Das Lichtmikroskop; 2. Aufl., G. Thieme Verlag, Stuttgart; New York (1985)
- Glocker, R., K. Gund, H. Langendorff u. F. Wachsmann: Tiefendosismessung an Elektronenstrahlen; Strahlentherapie 78, 321-325 (1949)
- Homberg, B.: On the permeability to lissamine green and other dyes in the course of cell injury and cell death; Exp. Cell Res. 22, 406-414 (1961)
- Köteles, G. J., T. Kubasova u. L. Varga: ^3H -Concanavalin A binding of X-irradiated human fibroblasts; Nature 259, 507-508 (1976)
- Köteles, J., T. Kubasova u. Z. Somosy: Derangement of cellular plasma membranes due to non-lethal radiation doses, in: Biological Effects of Low Level Radiation; Proceedings of a Symposium, Venedig, 11-15. April 1983, IAEA Wien 1983
- Kubasova, T., L. P. Varga u. G. J. Köteles: Surface alterations of mammalian cells upon ionizing radiation as detected by a lectinbinding technique. 1. Binding of Con. A by blood cells of irradiated mice; Int. J. Radiat. Biol. 40,175-186 (1981a)
- Kubasova, T., L. P. Varga u. G. J. Köteles: Surface alterations of mammalian cells upon radiation as detected by a lectin binding technique. 2. Binding of ConA by human blood cells irradiated in vitro, Int. J. Radiat Biol. 40,187-194 (1981b)
- Ohyama, H. u. T. Yamada: Appearance of cell fragments in thymocytes after whole body x-irradiation of rats; Scanning Electron Microscopy III, 1339-1343, SEM Inc., AMF O'Hare/Chicago (1983)
- Ojeda, F., M. Flores u. H. Folch,: Radiation induced loss of anti-IgG binding ability of lymphocytes; Z. Naturforschung 34c, 888-889 (1979)
- Pernis, B., L. Forni u. L. Amantes: Immunoglobulin Spots on the surface of rabbit lymphocytes; J. exp. Med. 132, 1001-1018 (1970)
- Rabellino, L. S. Colon, H. M. Grey u. Unanue, E. R.: Immunoglobulins on the Surface of Lymphocytes; Distribution and Quantitation; J. Exp. Med. 133, 156-167 (1971)
- Sato, C., K. Kojima u. K. Nishizawa: Target of X-irradiation and Dislocation of Sialic Acid in Decrease of Cell Surface Charge of Erythrocytes; Rad. Research 69, 367-374 (1977)
- Schuit, H. R. E., B. Hijmans und G. E. M. Asma: Identification of mononuclear cells in human blood; Clin. exp. Immunol. 41, 559-566 (1986)
- Sedlacek, H.H.: Die Zellmembranimmunfluoreszenz und ihre Anwendung bei der Lymphozytendifferenzierung; Lab. Med. 2, 192-199 (1978)
- Seiler, F. R., H. H. Sedlacek, E. J. Kanzo u. W. Lang: Über die Brauchbarkeit immunologischer Nachweismethoden zur Differenzierung funktionell verschiedener Lymphozyten: Spontanrosetten, Komplementrezeptor-Rosetten und Immunoglobulinrezeptoren; Behring Inst. Mitt. 52, 26-72, (1972)
- Somosy, Z., T. Kubasova, G. S. Ecsedi u. G. J. Köteles: Radiation-induced changes of negativ Charge on the cell surface of primary human fibroblasts; Int. J. Radiat. Biol. 49, 969-978 (1986)

- Virsik, R. R., Reinecke, Wolf u. D. Harder: Absence of fractionation, protraction, radiation quality and radical scavenger effects on radiation induced interphase death of human G₀-lymphocytes in vitro; *Strahlentherapie* 156, 839-844 (1980)
- Vranska, G., T. P. Pantev, L. T. Nikolov, N. J. Tyzhov u. V L Popov: Changes in electrophoretic mobility of erythrocytes exposed to ionizing radiation of various LET; *Int. J. Radiat. Biol.* 40, 455-459 (1981)
- Yamada, T. u. H. Ohyama: Changes in Surface Morphology of Rat Thymocytes Accompanying Interphase Death; *J. Radiat. Res.* 21, 190-196 (1980)

Die Autoren

Bidon, Paul

Dr. med. vet. Tierarzt
Hans-Scherr-Weg 14
73525 Schwäbisch Gmünd

Döll, Gerhard

Dipl. Phys., Dr. rer. nat.
Strahlenzentrum der Justus-Liebig-Universität, Gießen
Leihgesterner Weg 217
35392 Gießen

Fehre, Burghard

Tierarzt
Memmertweg 6
26419 Schorstens

Sattler, Ernst Ludwig

Professor Dr. rer. nat.
Strahlenzentrum der Justus-Liebig-Universität, Gießen
Leihgesterner Weg 217
35392 Gießen

Seibold, Georg

Dipl. Biol., Dr. rer. nat.
Strahlenzentrum der Justus-Liebig-Universität, Gießen
Leihgesterner Weg 217
35392 Gießen

Vökt, Bruno †

Tierarzt
35753 Greifenstein-Allendorf