

Vorsorgemedizin und Strahlenschutz (Risiko/Nutzen-Analyse)

Erholungsvorgänge nach Strahleneinwirkung

Medizinische Aspekte der Strahlenschutzgesetzgebung in verschiedenen europäischen Ländern

18. Jahrestagung der Vereinigung Deutscher Strahlenschutzärzte e. V.
und 3. Jahrestagung des Verbandes für medizinischen Strahlenschutz
in Österreich vom 3. bis 4. Juni 1977 in Salzburg

Strahlenschutz in Forschung und Praxis · Band XVIII

Herausgegeben von

Otfried Messerschmidt, Günther Möhrle

Rolf Zimmer

für die Vereinigung Deutscher Strahlenschutzärzte

Franz Holeczke, Franz Kainberger

Karl-Heinz Kärcher, Heinrich Mader, Rüdiger Seyss
für den Verband für medizinischen Strahlenschutz in Österreich

Mit Beiträgen von

| | | | |
|------------------|---------------|------------------|--------------------|
| H. Altmann | B. Herzberg | P. Krepler | H. R. Renfer |
| W. Angerstein | G. Hinz | H. Kristen | B. Richter |
| B. Baumann | H. Hofer | H. A. Ladner | R. Sauer |
| H. R. Beck | F. Holeczke | O. Messerschmidt | G. Schneider |
| T. Cremer | E. Junker | G. Möhrle | H. Spreizer |
| U. Dorn | F. Kainberger | B. Moser | K. H. Steinbach |
| H. Eriskat | W. Kallinger | H. Muth | A. F. G. Stevenson |
| T. M. Fliedner | A. Kaul | Wm. Penn | F.-E. Stieve |
| H.-J. Frischbier | P. Kindl | H. Raffler | K. Würthner |
| H. G. Heinze | W. König | L. Rausch | R. Zimmer |

59 Abbildungen und 46 Tabellen



Georg Thieme Verlag Stuttgart 1977

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Mitarbeiterverzeichnis | III |
| Vorwort | VII |
| | |
| ERHOLUNGSVORGÄNGE NACH STRAHLENEINWIRKUNG | 1 |
| | |
| H. Altmann | |
| DNA-Reparatur nach Strahleneinwirkung | 1 |
| | |
| T. M. Fliedner, K. H. Steinbach, H. Raffler | |
| Erholungsvorgänge im Stammzellbereich des Knochenmarks nach Strahlen- einwirkung | 4 |
| Einleitung | 4 |
| Die Bedeutung des Stammzellspeichers für die Aufrechterhaltung der Blut- zellbildung | 4 |
| Erholungsvorgänge im Stammzellspeicher nach einmaliger Ganz- oder Teil- körperbestrahlung: Welche Faktoren sind relevant? | 7 |
| Erholungsvorgänge im Stammzellenspeicher nach chronischer Strahlen- belastung: Welche Mechanismen führen zur „Toleranz“? | 15 |
| Zusammenfassung | 18 |
| | |
| A. F. G. Stevenson, T. Cremer, O. Messerschmidt | |
| Erholung und zytogerontologische Aspekte der menschlichen Bindegewebszellen nach Röntgen- und Neutronenbestrahlung | 20 |
| Resultate | 21 |
| Diskussion | 26 |
| | |
| R. Sauer | |
| Einfluß der Dosisleistung auf die Proliferationskapazität der hämatopoetischen Stammzelle in vivo nach Teilkörperbestrahlung | 30 |
| Methode | 30 |
| Ergebnisse und Diskussion | 31 |
| Schlußfolgerungen | 33 |
| Zusammenfassung | 34 |
| | |
| B. Baumann, H. Muth | |
| Zur Frage der Erholungsfähigkeit von Säugetieren nach akuter subletal er Ganz- körperbestrahlung mit energiereichen Strahlen unter Berücksichtigung des jugendlichen Organismus | 35 |
| Einleitung | 35 |
| Untersuchungsmethode | 35 |
| Ausgewählte Ergebnisse bisheriger tierexperimenteller Untersuchungen aus der Literatur | 36 |
| Eigene Untersuchungen | 38 |
| Ergebnisse | 39 |
| Zusammenfassung | 44 |

| | |
|--|-----|
| VORSORGEMEDIZIN UND STRAHLENSCHUTZ | 46 |
| (RISIKO/NUTZEN/ANALYSE) | |
| E.-E. Stieve | |
| Grundlagen der Risiko/Nutzen-Analyse bei Strahlenanwendungen in der Vorsorgemedizin | 46 |
| Einleitung | 46 |
| Der Begriff des Risikos in der Medizin | 46 |
| Risikogrößen | 48 |
| Risikofaktoren | 49 |
| Empfehlungen der ICRP zum Risiko in der Medizin | 51 |
| Das akzeptable Risiko | 53 |
| Risiko der Strahlenexposition zu Risiko der zu berechnenden Erkrankung | 57 |
| Zusammenfassung | 62 |
| E. Junker | |
| Die Bedeutung der Schirmbilduntersuchung der Thoraxorgane in der Vorsorgemedizin | 65 |
| W. Angerstein | |
| Die Strahlenbelastung bei Schirmbilduntersuchungen der Thoraxorgane und ihr Anteil an der Strahlenbelastung durch röntgendiagnostische Maßnahmen insgesamt | 76 |
| B. Richter, L. Rausch | |
| Abwägung von Nutzen, Kosten und Risiko bei der Mammographie | 82 |
| Einführung | 82 |
| Risiko | 83 |
| Dosis | 86 |
| Nutzen | 86 |
| Nutzen-Risiko-Vergleich | 89 |
| Kosten | 91 |
| Zusammenfassung | 92 |
| H.-J. Frischbier, K. Würthner | |
| Kritische Anmerkungen zur Risiko/Nutzen/Kosten-Diskussion bei der Mammographie aus klinischer Sicht | 95 |
| Wm. Penn | |
| Qualität, Dosis und Risikoraten in der Mammographie | 101 |
| F. Kainberger, W. Kallinger | |
| Dosismessungen bei der Mammographie | 104 |
| Durchführung der Messung | 104 |
| Dosimetrie | 105 |
| Phantom | 106 |
| Aufnahmebedingungen | 106 |
| Ergebnis | 106 |
| Zusammenfassung | 107 |
| G. Schneider, P. Kindl, H. Spreizer | |
| Messungen an einem neu entwickelten Mammaphantom | 110 |

| | |
|--|-----|
| H. G. Heinze | |
| Schilddrüsendiagnostik mit Radionukliden – Indikation und Aussagewert – | 115 |
| A. Kaul, B. Herzberg | |
| Grenzen der Dosisreduktion bei der Schilddrüsendiagnostik mit ^{123}I -Jodid | 123 |
| Einleitung | 123 |
| Physikalische Eigenschaften, Herstellung und radionukleare Reinheit von ^{123}I | 124 |
| Dosisberechnung | 127 |
| Ergebnisse | 129 |
| Zusammenfassung und Diskussion | 132 |
| H. Hofer, F. Kainberger, W. Kallinger | |
| Strahlenbelastung bei den Hüftgelenksröntgenuntersuchungen der Säuglinge | 134 |
| P. Krepler | |
| Vorsorgeuntersuchungen des Säuglingsbeckens | 139 |
| Einleitung | 139 |
| Methodik | 139 |
| Eigene Untersuchungen zur Häufigkeit klinisch symptomloser Hüftdysplasien | 140 |
| Diskussion der Voraussetzungen für Vorsorgeuntersuchungen | 142 |
| U. Dorn, H. Kristen | |
| Verringerte Strahlenbelastung bei Hüftgelenksuntersuchung von Säuglingen durch besondere Aufnahmetechnik | 146 |
| G. Hinz | |
| Zusammenfassende Darstellung des Aussagewertes von Vorsorgeuntersuchungen unter dem Gesichtspunkt des Strahlenschutzes | 148 |
| Berufserkrankungen | 149 |
| Entwicklungsankrankheiten | 150 |
| Infektionskrankheiten | 151 |
| Tumorfrühdiagnostik | 152 |
| H. R. Renfer | |
| Qualitätskontrolle in der medizinischen Radiologie | 154 |
| MEDIZINISCHE ASPEKTE DER STRAHLENSCHUTZGESETZGEBUNG | |
| 157 | |
| B. Moser | |
| Beitrag zur Strahlenschutzgesetzgebung in Österreich | 157 |
| H.-A. Ladner, G. Möhrle | |
| Einige medizinische Aspekte der Novellierung der Strahlenschutzverordnung in der Bundesrepublik Deutschland | 161 |
| H. R. Beck | |
| Deckungsvorsorge und Haftpflicht des Arztes beim Umgang mit radioaktiven Stoffen und beim Betrieb von Teilchenbeschleunigern | 165 |

| | |
|--|-----|
| F. Holeczke | |
| Die medizinische Überwachung strahlenexponierter Personen in Österreich | 168 |
| R. Zimmer | |
| Organisationsformen für die medizinische Überwachung in der Bundesrepublik | |
| Deutschland | 171 |
| Ermächtigter Arzt (E.A.) | 171 |
| Untersuchungen | 172 |
| Gesundheitsakte | 172 |
| Ärztliche Bescheinigung | 173 |
| Strahlenpaß | 173 |
| W. Angerstein, W. König | |
| Organisationsformen für die medizinische Überwachung in der Deutschen Demo- kratischen Republik | 174 |
| H. R. Renfer | |
| Organisationsform der medizinischen Überwachung in der Schweiz | 175 |
| H. Eriskat | |
| Organisationsformen für die medizinische Überwachung in verschiedenen Ländern | |
| der Europäischen Gemeinschaft | 176 |
| Anmerkungen | 183 |
| Sachverzeichnis | 187 |

Erholung und zytogerontologische Aspekte der menschlichen Bindegewebszellen nach Röntgen- und Neutronenbestrahlung

A. F. G. STEVENSON, T. CREMER, O. MESSERSCHMIDT

Zellkulturen werden bereits seit vielen Jahren als *in vitro* Modellsystem verwendet, um Phänomene der Erholung nach Bestrahlung auf zellulärer Basis zu studieren. Bisher verwendeten weitaus die meisten Untersucher heteroploide Zelllinien. Zellen solcher Linien wie z. B. die Hela-Zelle, zeigen keine zelluläre Alterung, d. h. die Zahl der Zellgenerationen die unter geeigneten Bedingungen aus einer Zelle hervorgehen können, ist beliebig groß. Euploide Kulturen aus normalen Bindegewebszellen verschiedener Spezies dagegen zeigen eine *in vitro* Seneszenz: Die Zahl der Zellgenerationen, die die Zellen durchlaufen können und damit die Proliferationskapazität der Kulturen ist begrenzt. Bei vollständiger Erholung sollten die nach Bestrahlung noch vermehrungsfähigen Zellen ebenso viele Generationen hervorbringen können wie die Zellen einer gleichalten Kontrollkultur. Die hier beschriebenen Experimente beschäftigen sich mit der Frage, ob die *in vitro* Seneszenz normaler menschlicher Bindegewebszellen durch den Bestrahlungseingriff verändert wird. Dabei wurde eine von der Firma Flow kommerziell erhältliche Fibroblastenkultur (Flow 2000) verwendet, die aus Lungengewebe eines männlichen Fötus angelegt wurde. Subkulturen wurden in unserem Labor eingefroren und dienten als Ausgangsmaterial für die einzelnen Experimente.

Der Einfluß energiereicher Strahlung auf Alterungsprozesse von Zellen *in vitro* wurde bisher nur in Ansätzen untersucht. FUKUSHIMA (6) fand eine Verkürzung der klonalen Lebensspanne asexuell vermehrter Paramecien bei chronischer Bestrahlung. MACIEIRA-COELHO (10) u. Mitarb. zeigten, daß die Proliferationskapazität von Hühnerfibroblastenkulturen durch Bestrahlung mit einer ^{60}Co -Quelle verkürzt wird. Ein derartiger Effekt wurde auch für menschliche Fibroblasten nachgewiesen (13), die zu Beginn der Phase III bestrahlt wurden, fand sich aber nicht bei Kulturen der Phase II. Ein Erläuterung der Phasen II und III einer Fibroblastenkultur findet sich im nächsten Abschnitt. Bei den Untersuchungen von MACIEIRA-COELHO u. Mitarb. (14, 15) wurde eine sehr niedrige Dosisleistung von 0,28 rd/min. bei fraktionierter Gabe der Gesamtdosis gewählt. Bei den eigenen Untersuchungen erhielten Kulturen während der Phase I eine einmalige Bestrahlung bei wesentlich höherer Dosisleistung.

Zum Verständnis unseres experimentellen Ansatzes möchten wir auf einige wesentliche Eigenschaften euploider Fibroblastenkulturen des Menschen hinweisen. Die Anheftung der Zellen auf dem Boden eines geeigneten Kulturgefäßes ist eine notwendige Voraussetzung für das Zellwachstum. Bei einer bestimmten Zelldichte sistiert die Proliferation. Man spricht von Kontakt-Inhibition oder vorsichtiger von dichteabhängiger Inhibition der Zellproliferation. Die Inhibition wird beendet, wenn man die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes ablöst, beispielsweise mit Hilfe einer Trypsinlösung, und auf neue Kulturgefäße verteilt. Auf diese Weise kann man die Bindegewebszellen ständig im Zustand der Proliferation halten.

Seit der Arbeit von CARREL (1) nahm man für mehrere Jahrzehnte an, daß Bindegewebszellen sich unter geeigneten Bedingungen unbegrenzt weitervermehren können. 1961 zeigten HAYFLICK und MOORHEAD (7) erstmals, daß nach der Etablierung einer menschlichen Fibroblastenkultur *in vitro* (Phase I) die Zellen zunächst bei aufeinanderfolgenden Subkulturen eine gleichbleibend kräftige Proliferation zeigen (Phase II). Nach einer bestimmten Zahl von Verdoppelungen der Zellpopulation wird die Proliferation jedoch unaufhaltsam schlechter (Phase III) und sistiert schließlich.

Zwar kann die Zahl der Kulturpassagen bis zum Eintritt in die Phase III durch die Kulturbedingungen, z. B. die Gasatmosphäre und die Zusammensetzung des Mediums, beeinflußt werden, doch erwies sich die Proliferationskapazität der Kulturen unter allen bis heute erprobten Bedingungen als begrenzt. Zahlreiche Forscher nehmen an, daß diese Begrenzung der Proliferationskapazität genetische Ursachen hat, die möglicherweise auch eine zelluläre Seneszenz *in vivo* bedingen. Sie hoffen daher, daß eine Aufklärung der Ursachen dieser Begrenzung einen Schlüssel zum Verständnis von Alterungsprozessen auf molekularem Niveau bieten wird. Ein einfach zu bestimmender Parameter, der es erlaubt, den Alterungszustand einer Fibroblastenkultur zu bestimmen, wurde von CRISTOFALO und SHARP (3) eingeführt. Nach Zugabe von Tritium-markiertem Thymidin ($^3\text{HTdR}$) wird autoradiographisch der Anteil der Zellen bestimmt, die zur DNA-Replikation fähig sind. Dieser nach CRISTOFALO bezeichnete Index sinkt mit zunehmender Zahl der Kulturpassagen ab.

Resultate

Bei den eigenen Untersuchungen, deren experimentelles Schema in Abb. 1 dargestellt ist, erhielten Kulturen während der Phase II eine einzige Bestrahlungsdosis. Dazu wurden harte Röntgenstrahlen (250 kV, 12mA, Filter: 6 mm Al und 0,7 mm Cu) bei einer Dosisleistung von 93 R/min. oder 8 R/min. oder monoenergetische Neutronen mit 15 MeV verwendet. Die Neutronen wurden durch eine D-T-Reaktion mit Hilfe eines van de Graaf'schen Generators erzeugt. Die Dosisleistung bei der Neutronenbestrahlung betrug 8 rd/min. Die bestrahlte Kultur und die zugehörige Kontrollkultur wurden jeweils parallel geführt. Als Kulturmedium diente „minimum essential medium“ (MEM) von Eagle mit einem Zusatz von nicht-essentiellen Aminosäuren und 12% fötalem Kälberserum. Die Züchtung erfolgte in einem Inkubator mit gesättigter Luftfeuchtigkeit und einer Atmosphäre aus Luft mit einem Anteil von 5% CO_2 bei 37 °C. Die Subkultivierung wurde nach dem von HAYFLICK (7, 8) angegebenen Verfahren durchgeführt. Alle für die Kultur benötigten Lösungen wurden für die bestrahlte Kultur und die Kontrollkultur gemeinsam angesetzt und verwendet. Beide Kulturen wurden in einem Brutschrank gehalten. Diese Bedingungen gewährleisten, daß unbemerkte Veränderungen der Zellkulturparameter im Verlauf der Langzeit-Experimente sich auf beide Kulturen in gleicher Stärke auswirken können.

Abb. 2 zeigt den dosisabhängigen Effekt der Röntgenstrahlen auf Wachstumskurven bestrahlter Zellen. Bei diesem Experiment wurden Kulturen im konfluenten Zustand mit 93 R/min. bestrahlt und anschließend je 2×10^5 Zellen in Kulturgefäße mit 25 cm^2 Bodenfläche eingesät. Während die Zellvermehrung nach einer Bestrahlung mit 10 000 R voll-

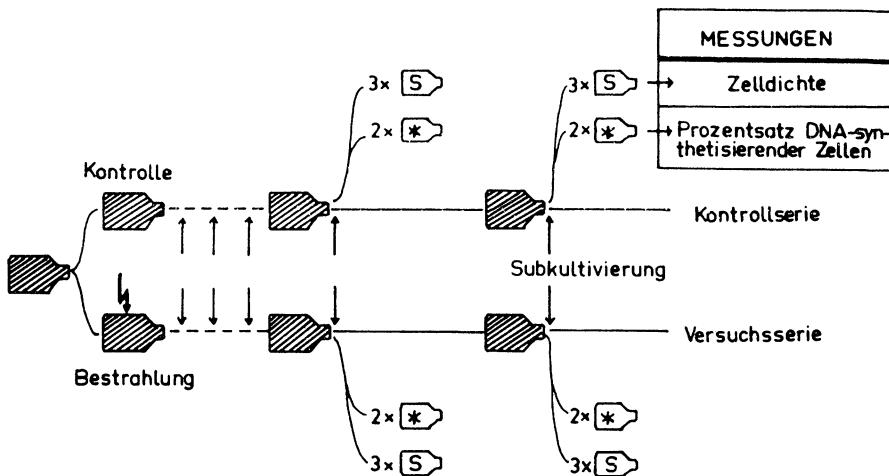


Abb. 1 Experimentelles Schema: Konfluente Kulturen erhielten eine einmalige Bestrahlungsdosis. Parallel laufende scheinbestrahlte Kulturen dienten als Kontrollen. Bei jeder Kulturpassage wurden zusätzliche Subkulturen angelegt, um die Zelldichte nach 1 Woche Proliferation und den Prozentsatz DNA replizierender Zellen zu bestimmen. Die Zelldichte wurde in jeweils drei fixierten und gefärbten Subkulturen ausgezählt. Der Prozentsatz DNA replizierender Zellen wurde autoradiographisch in jeweils zwei Subkulturen ermittelt, die für 72 Stunden nach der Zelleinsaat Tritium-markiertes Thymidin erhielten.

ständig sistierte, erfolgte nach einer Bestrahlung mit 500 und 1000 R eine Repopulation der Kulturen durch klonal wachsende Zellen. Ihr Prozentsatz beträgt nach Bestrahlung mit 1000 R schätzungsweise weniger als 1% (4). Das Volumen der irreversibel geschädigten Zellen wird in den ersten Tagen nach der Bestrahlung deutlich größer als bei den Kontrollzellen (Abb. 3).

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß eine Zunahme des Zellvolumens auch der Degeneration von Fibroblasten in seneszenten Kulturen vorausgeht. Nach drei bis vier Wochen und mehreren Subkultivierungen, um die Zellen der wachsenden Klone gleichmäßig zu verteilen, bestehen die bestrahlten Kulturen überwiegend aus Nachkommen der klonal wachsenden Zellen. Die weitere Züchtung erfolgte nach dem gleichen Schema wie bei den Kontrollkulturen, die fortlaufend im Abstand von einer Woche umgesetzt wurden. Dabei wurden jeweils 8000 Zellen pro cm^2 Bodenfläche des Kulturgefäßes eingesetzt. Während der Phase III wurde der Zeitraum zwischen aufeinanderfolgenden Passagen auf zwei bis vier Wochen ausgedehnt, um genügend Zellen für die weitere Kultivierung zu erhalten. Die in den Abbildungen 5 bis 7 aufgeführte Zeitskala der Versuche ist in diesem Abschnitt der Experimente daher nicht linear. Als Parameter für die Proliferationsfähigkeit der Kulturen während der einzelnen Passagen wurde die nach einer Woche erreichte Zelldichte, die bei Kulturen der Phase II der Sättigungsdichte entspricht, und der Prozentsatz der Zellen bestimmt, die im Verlauf von 72 Stunden nach der Einstaats DNA-Replikation zeigen. Abb. 4 zeigt, daß die Inkubation mit Tritiumthymidin ($^3\text{HTdR}$) für diesen Zeitraum ausreicht, um praktisch alle DNA replizierenden Zellen einer Passage autoradiographisch zu erfassen. Bei einer Sättigungsdichte der Zellen von etwa $8-9 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 während der Phase II entspricht die gewählte Zelleinsaat einem Teilungsverhältnis von etwa 10 : 1 bei jeder Subkultivierung. Bis zur 25. Passage wurden die Kulturen im Verhältnis 2 : 1 geteilt.

Bei einem Vergleich mit Literaturdaten (8) ist zu berücksichtigen, daß die bis zur Seneszenz der Kulturen erreichte Passagezahl geringer ist als die Zahl der kumulativen

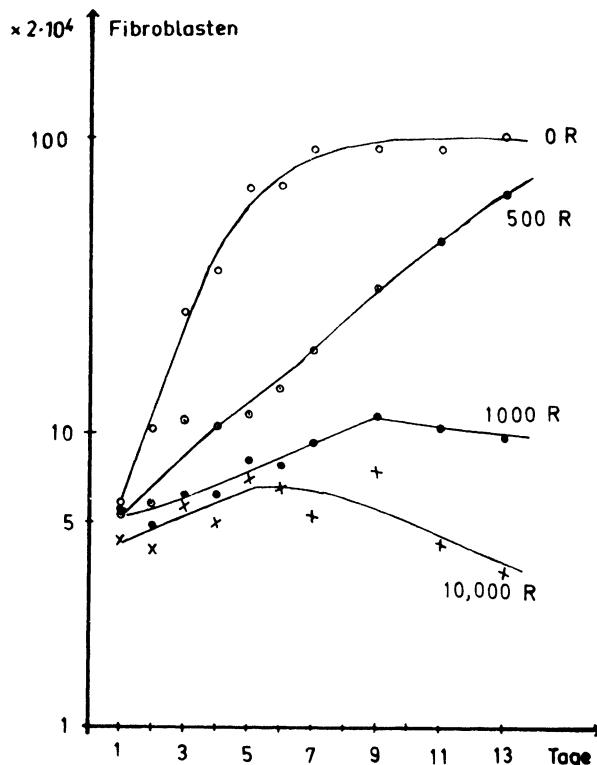


Abb. 2 Wachstumskurven zeigen die dosisabhängige Wirkung einer einmaligen Röntgenbestrahlung auf die zelluläre Vermehrungskapazität. Das Wachstum bestrahlter Kulturen ist auf klonale Repopulation zurückzuführen.

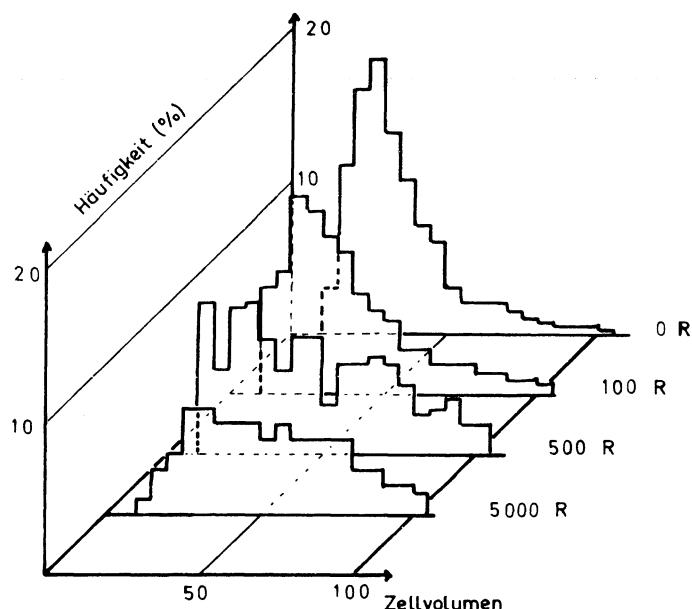


Abb. 3 Dosisabhängige Veränderung der Zellgröße 3 Tage nach einer einmaligen Röntgenbestrahlung. Die Abbildung zeigt in willkürlichen Einheiten die Zellvolumenverteilung, gemessen mit einem Coulter Counter.

Populationsverdoppelungen. Die Abbildungen 5, 6 und 7 zeigen das Ergebnis von Bestrahlungsversuchen, die mit Röntgenstrahlen bei einer Dosisleistung von 93 R/min. und einer Dosis von 500 und 1000 R durchgeführt wurden. Vier Wochen nach der Bestrahl-

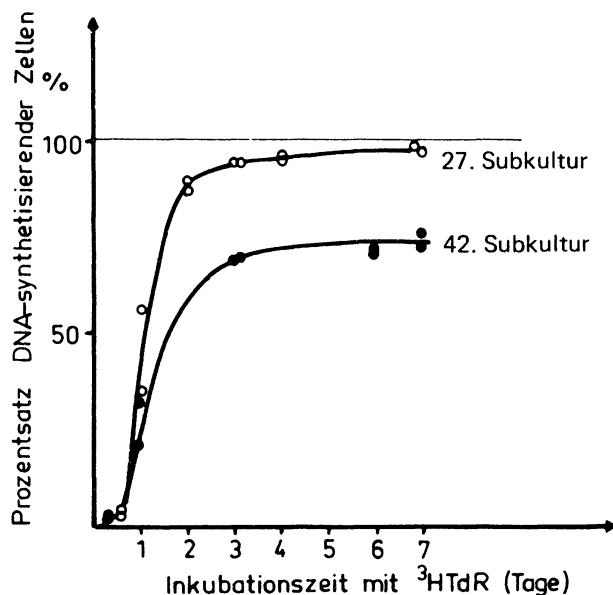


Abb. 4 $^{3}\text{HTdR}$ -Markierungsindex von zwei Kulturpassagen in Phase II und Phase III. Zunehmendes Alter (Passagezahl) führt zu einer deutlichen Abnahme des Prozentsatzes der DNA-synthetisierenden Zellen. Die Markierungssättigung wurde nach 72 Stunden Inkubationsdauer erreicht.

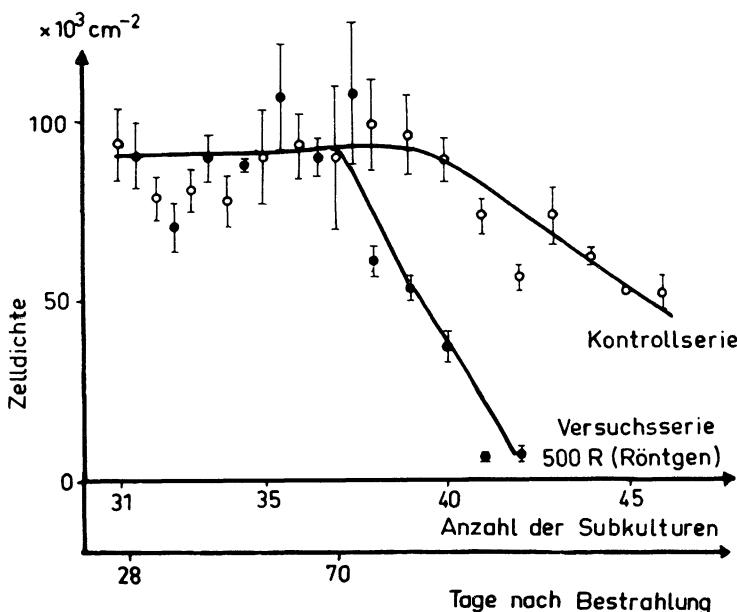


Abb. 5 Die Zellwachstumsdichte einer röntgenbestrahlten Kultur (500 R; Dosisleistung 93 R/min.) wurde bei jeder Kulturpassage mit derjenigen einer scheinbestrahlten Kontrollkultur verglichen. Bestrahl wurde die 28. Subkultur.

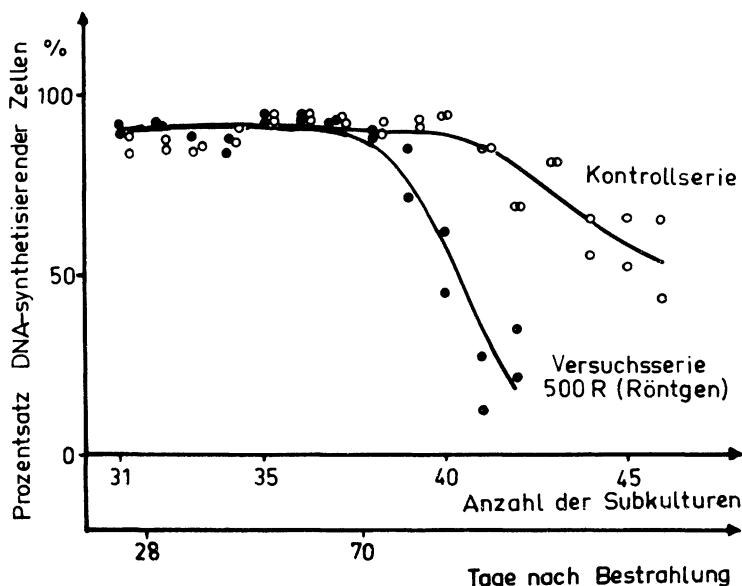


Abb. 6 Prozentsatz DNA-synthetisierender Zellen (3 HTdR-Markierungsindex nach 72 Stunden Inkubationsdauer) in Abhängigkeit von der Passagezahl für die Kulturen, deren Zellwachstumsdichte in Abb. 5 dargestellt ist.

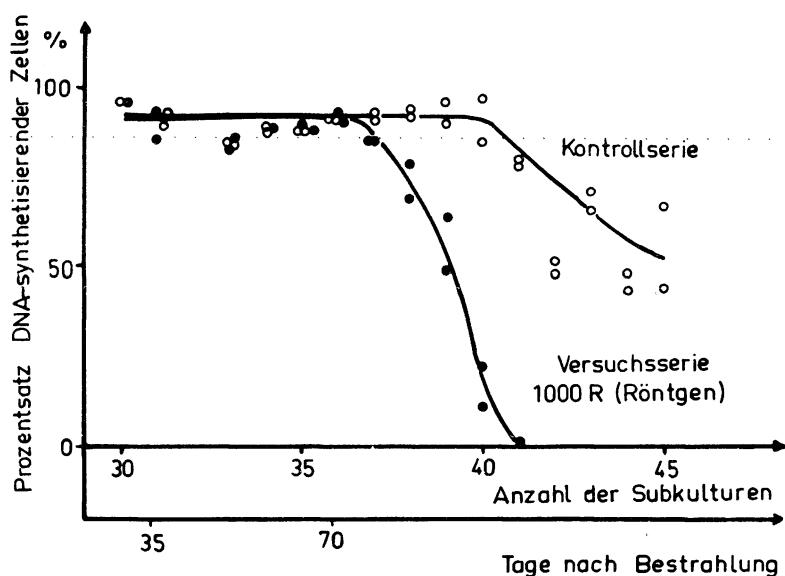


Abb. 7 3 HTdR-Markierungsindex nach Röntgenbestrahlung der 25. Subkultur mit 1000 R (Dosisleistung 93 R/min.).

lung wiesen die bestrahlten Kulturen die gleiche Sättigungsdichte und den gleichen Prozentsatz DNA replizierender Zellen auf wie die Kontrollkulturen. Nach einer Reihe weiterer Passagen zeigte sich aber ein deutlich früherer Eintritt der bestrahlten Kulturen in die Phase III. Im Gegensatz zu CRISTOFALO und SHARF (3), die einen Abfall des Anteils DNA replizierender Zellen bereits im Verlauf der Phase II beobachtet haben, finden wir einen deutlichen Abfall erst zu Beginn der Phase III in guter Übereinstimmung mit der Abnahme des Wachstums der Kulturen (vgl. Abb. 5 mit Abb. 6). In einem weiteren Experiment mit Röntgenstrahlen wurde bei einer Dosis von 500 R die Dosisleistung um den Faktor 11,6 herabgesetzt. Hier war ein vorzeitiger Eintritt der während der 36. Passage bestrahlten Kultur in die Phase III nicht nachzuweisen (Abb. 8). Bei einer Bestrahlung mit Neutronen (ebenfalls während der 36. Passage) wurde dagegen bei einer Dosis von 500 rd und einer Dosisleistung von 8 rd/min. ein im Vergleich zur Kontrollkultur vorzeitiges Altern der bestrahlten Kultur beobachtet (Abb. 9).

Diskussion

Unsere Befunde zeigen, daß nach einer einzeitigen Röntgenbestrahlung mit 1000 R die wenigen teilungsbefähigten Fibroblasten der Kultur noch eine große Proliferationskapazität besitzen. Doch führt die einmalige Bestrahlung von Kulturen während der Phase II mit Röntgenstrahlen oder Neutronen zu einer vorzeitigen *in vitro* Seneszenz der Kulturen. Die Befunde sprechen für einen Einfluß der Dosisleistung und der Strahlenqualität. Bei Röntgenbestrahlung mit 500 R trat der Effekt vorzeitiger *in vitro* Seneszenz bei einer Dosisleistung von 93 R/min. auf, dagegen nicht bei einer Dosisleistung von 8 R/min. (vgl. Abb. 6 mit Abb. 8).

Bestrahlung mit Neutronen erwies sich als effektiver als Röntgenstrahlung, da bei vergleichbarer Dosis ein Effekt der Neutronen bei einer Dosisleistung von 8 rd/min. nachgewiesen wurde (Abb. 9). Wir vermuten, daß die bei den Versuchen von MACIEIRA-

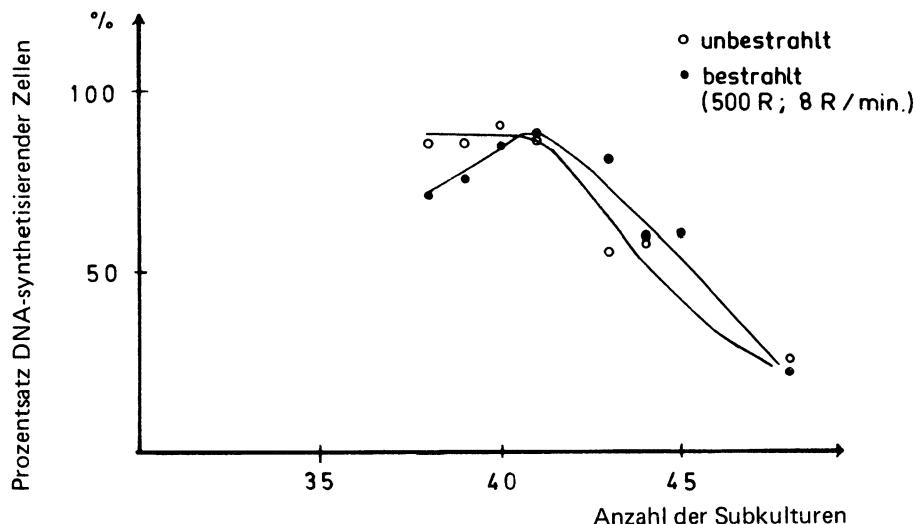


Abb. 8 $^{3}\text{HTdR}$ -Markierungsindex nach Röntgenbestrahlung der 36. Subkultur mit 500 R (Dosisleistung 8 R/min.). Ein vorzeitiger Abfall des Markierungsindex der bestrahlten Kultur ist nicht erkennbar.

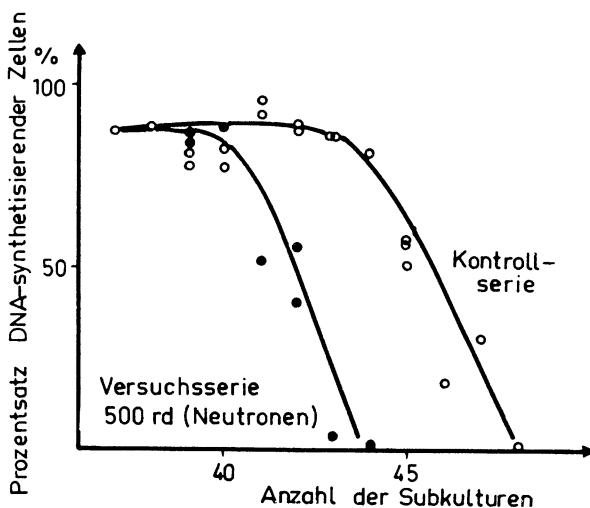


Abb. 9 $^{3}\text{HTdR}$ -Markierungsindex nach Bestrahlung der 36. Subkultur mit schnellen Neutronen (15 MeV). Die Dosis betrug 500 rd bei einer Dosisleistung von 8 rd/min. Ein vorzeitiger Abfall des Markierungsindex ist festzustellen.

COELHO u. Mitarb. (14, 15) verwendete sehr niedrige Dosisleistung, abgesehen von Unterschieden in der Strahlenqualität und im Bestrahlungsschema, ein wesentlicher Faktor ist, daß die Bestrahlung menschlicher Fibroblastenkulturen in der Phase II im Gegensatz zu unseren Experimenten mit 29 bis 330fach höherer Dosisleistung nicht zu vorzeitiger *in vitro* Seneszenz führte.

Der entscheidende Punkt für eine Weiterführung der Untersuchungen besteht in der Frage, ob der vorzeitige Eintritt bestrahlter Kulturen in die Phase III auf eine verkürzte klonale Lebensspanne der bestrahlten, aber weiter teilungsfähigen Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen zurückzuführen ist. Unter klonaler Lebensspanne verstehen wir die Zahl der Zellgenerationen, die die Nachkommenschaft einer Zelle bis zum Ende der Teilungsfähigkeit durchlaufen kann. Die von MACIEIRA-COELHO u. Mitarb. (13) und von uns vorgelegten Befunde sind kein schlüssiger Beweis für einen Effekt der Bestrahlung auf die klonale Lebensspanne normaler menschlicher Bindegewebszellen. Der vorzeitige Eintritt bestrahlter Kulturen in die Phase III könnte möglicherweise bedeuten, daß die überlebenden Zellen der bestrahlten Kultur während der Erholungsphase der Kultur mehr Zellteilungen durchführen als die Zellen der Kontrollkultur und deshalb ihre Proliferationskapazität rascher erschöpfen. Wir beabsichtigen daher, in weiteren Untersuchungen die klonale Lebensspanne bestrahlter und unbestrahlter Fibroblasten direkt zu vergleichen.

Seit den Experimenten von RUSS und SCOTT (19) wird die Hypothese vertreten, daß energiereiche Strahlung zu einem vorzeitigen Auftreten bzw. zu einer Beschleunigung natürlicher Alterungsprozesse führt. Ein kürzlich erschienener Bericht der Atomic Bomb Casualty Commission (5) geht erneut auf diesen Aspekt ein. Tierexperimentelle Befunde zeigen, daß energiereiche Strahlung dosisabhängig zu einer Verkürzung der mittleren Lebenserwartung und zum vorzeitigen Auftreten verschiedener neoplastischer Erkrankungen führt (2, 11, 12, 16). WALBURG (20) hat die Problematik von Tierexperimenten zur Frage eines strahleninduzierten Alterns ausführlich diskutiert und dargelegt, daß die bisher vorliegenden Befunde nicht ausreichen, um die Frage schlüssig zu beantworten.

Wir sind uns der Problematik bewußt, aus Untersuchungen über die *in vitro* Seneszenz von Fibroblastenkulturen Rückschlüsse auf zelluläre Mechanismen der Alterung *in vivo* zu ziehen. Die Bedeutung von HAYFLICKs Ansatz (8) für das Verständnis der molekularen Basis des Alterns ist umstritten. Für eine Darstellung der Befunde, die für eine

Korrelation der *in vitro* Seneszenz von Fibroblasten mit zellulären Alterungsvorgängen *in vivo* sprechen, verweisen wir auf Übersichtsartikel (9); unter anderem wurde gezeigt, daß die Proliferationskapazität von Fibroblastenkulturen mit dem Alter des Zellspenders abnimmt.

Diese Befunde rechtfertigen aber nicht die Behauptung, daß die begrenzte Vermehrungsfähigkeit bestimmter Zellsorten bei der natürlichen Alterung des Menschen eine wichtige Rolle spielt. Zahlreiche funktionelle Veränderungen gehen jedoch dem Verlust der Teilungsfähigkeit *in vitro* voraus (9). Diese Veränderungen sind es, die nach Ansicht von HAYFLICK ein Äquivalent von zellulären Alterungsvorgängen *in vivo* darstellen könnten. Die maximale Proliferationskapazität einer Fibroblastenkultur ist in diesem Zusammenhang zunächst nichts weiter als ein einfach zu messender Parameter. Kritiker der *in vitro* Experimente wenden ein, daß die *in vitro* Seneszenz der Fibroblasten nur Ausdruck der bis heute nicht genügend optimierten Kulturbedingungen ist. Dabei wird häufig auf die hohe Proliferationskapazität der pluripotenten Stammzellen des Knochenmarkes verwiesen. Dieser Einwand berücksichtigt nicht, daß die maximal mögliche Zahl der Zellgenerationen bei den verschiedenen Zellsorten proliferierender Gewebe unterschiedlich sein kann, ein Umstand, auf den bereits der Zoologe August WEISMANN 1881 bei einer Tagung in Salzburg (21) hingewiesen hat, der als erster die Vermutung aussprach, daß „der Modus und die Quantität der Fortpflanzung in der spezifischen Natur der Zelle selbst begründet ist und keineswegs etwa bloß von ihrer Ernährung abhängt“ (22).

Heute existieren zahlreiche Theorien zum molekularen Mechanismus der zellulären Alterung. Sie reichen von der Vorstellung eines genetisch gesteuerten Alterungsprozesses (23) bis zur Annahme einer Fehlerkatastrophe (17) als Folge einer unvermeidlichen Anhäufung von Fehlern in den Makromolekülen. Man könnte an eine Akkumulation von Schäden im Sinne eines „multiple target“ oder eines „multiple hit“ Systems denken, wie es bei der Deutung der Effekte ionisierender Strahlung vielfach benutzt wird. Eine solche Vorstellung schließt die Möglichkeit ein, daß ein genetisch programmiert Prozeß bei der *in vitro* Seneszenz von Fibroblasten beteiligt ist. Dieser Prozeß könnte eingeleitet werden, wenn eine kritische Zahl der „targets“ betroffen ist. Die mittlere Zeitdauer, nach der dieser kritische Schwellenwert erreicht wird, würde vom genetisch vorgegebenen Arsenal an Reparatursystemen abhängen. Energieriche Strahlung verkürzt nach dieser Vorstellung die Zeitdauer bis zur Erreichung des Schwellenwertes. Von der Art der Strahlung, der Dosis und der Dosisleistung hängt ab, in welchem Umfang die Reparatursysteme die Strahlenschäden beseitigen können.

Eine zentrale Idee dieser Vorstellung, wie aller Fehlertheorien des zellulären Alterns (17, 18), besteht darin, daß die Akkumulation weiterer Fehler durch die gegenseitige Verknüpfung zwischen inakkurater Proteinsynthese und inakkurater DNA-Synthese um so rascher erfolgen kann, je größer die Zahl der Fehler in den makromolekularen Zellkomponenten bereits ist. Ein Fehler in der Proteinsynthese beispielsweise kann zur Bildung einer „mutator“ DNA Polymerase und zu somatischen Mutationen führen. Somatiche Mutationen wiederum können Gene betreffen, von denen die Genauigkeit der Proteinsynthese abhängt. Damit kann ein sich selbst verstärkender Prozeß der Fehlerakkumulation eingeleitet werden. Es ist anzunehmen, daß die Phase der DNA-Replikation im Zellzyklus bei diesem Prozeß besonders kritisch ist. Diese Annahme macht verständlich, daß der Eintritt der *in vitro* Seneszenz der Fibroblasten von der Anzahl vorangegangener Zellgenerationen, also der Anzahl vorausgegangener S-Phasen, abhängig ist.

Zwei Aspekte der hier vorgelegten Untersuchung möchten wir – unabhängig vom Ausgang der Kontroverse um die Bedeutung von *in vitro* Experimenten zur zellulären Seneszenz – betonen:

1. Es erscheint möglich, daß die vorzeitige Seneszenz der bestrahlten Kulturen die Folge latenter Zellschäden ist, die sich erst spät manifestieren. Die Erholung der nach der Bestrahlung klonal wachsenden Fibroblasten wäre dann nicht vollständig, obwohl diese

Zellen für einen längeren Zeitraum (Abb. 5-7) im Hinblick auf die Sättigungszelldichte und den Cristofalo-Index keinen Unterschied zu den Kontrollzellen erkennen lassen. Die Kultur euploider menschlicher Fibroblasten bietet damit einen experimentellen Ansatz zur Untersuchung der Frage, ob Spätschäden einer Bestrahlung auch nach vielen Zellgenerationen noch manifest werden können.

2. Die Alterung der bestrahlten Kulturen tritt vorzeitig ein, obwohl identische Kulturbedingungen gewählt wurden. Dieser Befund spricht gegen die Vorstellung, die *in vitro* Seneszenz von normalen Bindegewebszellen sei ausschließlich auf nicht genügend optimierte Kulturbedingungen zurückzuführen.

Wir danken Frau Christine KUNZE für technische Unterstützung während der Durchführung der Experimente.

Literatur

- 1 Carrel, A.: On the permanent life of tissues outside of the organism. *J. exp. Med.* 15 (1912) 516
- 2 Cottier, H.: Strahlenbedingte Lebensverkürzung. Springer, Berlin 1961
- 3 Cristofalo, V. F., B. B. Sharf: Cellular senescence and DNA synthesis. *Exp. Cell Res.* 76 (1973) 419
- 4 Cox, R., W. K. Mason: Changes in the radiosensitivity during the *in vitro* growth of diploid human fibroblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* 26 (1974) 193
- 5 Finch, S. C., G. W. Beebe: Review of thirty years study of Hiroshima and Nagasaki Atomic Bomb Survivors: II. Biological Effects. *F. Aging. J. Radiat. Res. Supplement* 16 (1975) 108
- 6 Fukushima, S.: Effect of X-Irradiation of the clonal lifespan and fission rate in *paramecium aurelia*. *Exp. Cell Res.* 84 (1974) 267
- 7 Hayflick, L., P. S. Moorhead: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25 (1961) 585
- 8 Hayflick, L.: The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37 (1965) 614
- 9 Hayflick, L.: Cytogerontology: Theoretical aspects of aging. Academic Press, New York 1974
- 10 Lima, L.: E. Malaise, A. Macieira-Coelho: Aging *in vitro*: Effect of low dose rate irradiation on the division potential of chick embryonic fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 73 (1972) 345
- 11 Lindop, P., J. Rotblat: Aging effects of ionizing radiations. *Proc. 2nd U.N. Int. Conf. on the peaceful uses of Atomic Energy*, Geneva 1958, Bd. 22, S. 46, New York 1958
- 12 Loutit, J. F.: Irradiation of mice and men: Radiation and aging. University of Chicago Press, Chicago 1962
- 13 Macieira-Coelho, A., C. Diatloff, E. Malaise: Doubling potential of fibroblasts from different species after ionizing radiation. *Nature* 261 (1976) 586
- 14 Macieira-Coelho, A., C. Diatloff, E. Malaise: Effect of low dose rate irradiation on the division potential of cells *in vitro*: II. Mouse lung fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 100 (1976) 228
- 15 Macieira-Coelho, A., C. Diatloff, E. Malaise: Concept of fibroblast aging *in vitro*: Implications for Cell Biology Gerontologia (Basel) 23 (1977) 290
- 16 Muramatsu, S.: Effects of continuous gamma radiation on the life-span of mice. *J. Radiat. Res.* 13 (1972) 230
- 17 Orgel, L. E.: The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proc. nat. Acad. Sci.* 49 (1963) 517
- 18 Orgel, L. E.: Aging of clones of mammalian cells. *Nature* 243 (1973) 441
- 19 Russ, S., G. M. Scott: Biological effects of gamma irradiation. *Brit. J. Radiol.* 12 (1939) 440
- 20 Walburg, H. E., jr.: Radiation-induced life shortening and premature aging. *Ed. J. T. Lett, H. Adler, Adv. Radiat. Biol.* 5 (1975) 145
- 21 Weismann, A.: Über die Dauer des Lebens. Vortrag auf der deutschen Naturforscherversammlung zu Salzburg am 21. Sept. 1881
- 22 Weismann, A.: Aufsätze über Vererbung und verwandte biologische Fragen. Fischer, Jena 1892
- 23 Wilson, D. L.: The programmed theory of aging: Theoretical aspects of aging. Academic Press, New York 1974